

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PALOMA BONATO

GENES DO METABOLISMO DE NITRATO EM *Herbaspirillum seropedicae*:
REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL E ANÁLISE FUNCIONAL

CURITIBA
2012

PALOMA BONATO

GENES DO METABOLISMO DE NITRATO EM *Herbaspirillum seropedicae*:
REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL E ANÁLISE FUNCIONAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Liu Un Rigo

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Roseli Wassem

CURITIBA
2012

TERMO DE APROVAÇÃO

PALOMA BONATO

GENES DO METABOLISMO DE NITRATO EM *Herbaspirillum seropedicae*: REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL E ANÁLISE FUNCIONAL

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Profª Drª Liu Un Rigo (orientadora)

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Profª Drª Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth

Departamento de Patologia Médica – UFPR



Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Curitiba, 16 de fevereiro de 2012.

Dedico este trabalho
aos meus pais Alvacir e Marcia,
ao meu irmão Murilo
e ao meu querido Doumit.
Por estarem sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras Liu Un Rigo e Roseli Wassem por todo o apoio, incentivo, orientação e oportunidade de trabalhar neste projeto.

Aos demais professores do Núcleo de Fixação de Nitrogênio (NFN), em especial ao Professor Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de trabalhar no NFN e ao Professor Emanuel Maltempi de Souza pelas discussões e sugestões.

À coordenação do Curso de Pós-graduação em Ciências-Bioquímica e aos demais professores do Departamento de Bioquímica.

Aos colegas da turma de mestrado 2010/2011 pelo companheirismo.

Aos colegas de laboratório das salas 271/272, 275/279 e Anexo pelo auxílio na execução de experimentos, pelas sugestões e pela amizade.

À Dona Rose e ao Valter por todo apoio técnico.

Ao CNPq e ao INCT-Fixação Biológica de Nitrogênio pelo apoio financeiro.

Ao meu querido Doumit por ser meu amor e por todo o apoio e discussões.

Aos meus pais Alvacir e Marcia e ao meu irmão Murilo por todo o carinho, apoio e compreensão.

“Nos campos da observação,
o acaso favorece as mentes preparadas”

Louis Pasteur

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae, membro do grupo β -proteobactérias, é uma bactéria fixadora de nitrogênio e endofítica que se associa com gramíneas de interesse comercial. Além de apresentar genes envolvidos com a fixação de nitrogênio, este microrganismo também apresenta vários genes envolvidos com o metabolismo de nitrato. Entre estes últimos, estão os genes que codificam para prováveis nitrato redutase assimilatória (*nasA* e *Hsero_2899*) e nitrato redutase respiratória (*narGHJ*). Entretanto, o papel desta última enzima em *H. seropedicae* não é conhecido, uma vez que este microrganismo não é capaz de crescer em anaerobiose utilizando nitrato como fonte única de nitrogênio. Além de conter genes que codificam para prováveis nitrato redutases, *H. seropedicae* também contém genes que codificam para prováveis transportadores de nitrato (*narK*, *narK₁U* e *nasFED*) e proteínas regulatórias (*nasR* e *narXL*). A regulação transcricional de vários destes genes já foi estudada anteriormente, no entanto, ela ainda não é completamente entendida. Desse modo, com o intuito de melhor compreender a regulação de genes envolvidos com o metabolismo de nitrato em *H. seropedicae* e entender quais são os papéis das nitrato redutases deste microrganismo, neste trabalho foram utilizadas três abordagens. Primeiramente, RNA total a partir de *H. seropedicae* estirpe SmR1 crescido em nitrato como fonte única de nitrogênio foi extraído, depletado de rRNA e usado para análise transcricional através de RNAseq, em plataforma SOLiD. O transcriptoma de células crescidas em nitrato foi comparado com transcriptoma de *H. seropedicae* crescido na presença de amônio. De um total de 4804 genes, 1619 estavam diferencialmente expressos, 377 dos quais estavam induzidos e 1242 reprimidos. Os genes *narGHI* estão entre os genes mais induzidos em nitrato. Os genes que codificam para a provável nitrato redutase assimilatória também estavam induzidos. Na segunda abordagem, ensaios de β -galactosidase foram utilizados para estudar a regulação dos operons *narXL*, *narK₁UGHJImoaA* e *nasFED*. A expressão dos operons *narXL* e *narK₁UGHJImoaA* foi induzida em baixo nível de oxigenação por Fnr. A expressão do último operon também foi induzida por nitrato. A expressão do operon *nasFED* foi induzida por nitrato e em condições limitantes de nitrogênio através das proteínas membros do sistemas de dois componentes NtrB/NtrC e NtrY/NtrX. Finalmente, na terceira abordagem, estirpes mutantes *nasA* e *narG* de *H. seropedicae* foram construídas e caracterizadas. Quando estas estirpes foram cultivadas em nitrato como fonte de nitrogênio, o mutante *narG* mostrou um crescimento mais lento em relação a estirpe selvagem, enquanto que o mutante *nasA* não foi capaz de crescer. Os resultados sugerem que a nitrato redutase assimilatória é essencial para assimilação de nitrato, mas o papel da nitrato redutase respiratória ainda não é conhecido.

Palavras-chave: *Herbaspirillum seropedicae*. Metabolismo de nitrato.

ABSTRACT

Herbaspirillum seropedicae is an endophytic nitrogen-fixing bacterium that associates with gramineous plants of economic importance. In addition to genes involved with nitrogen fixation, this microorganism also contains some genes involved with nitrate metabolism, including genes encoding a putative assimilatory (*nasA* e *Hsero_2899*) and a respiratory nitrate reductase (*narGHJI*). However, the role of the latter enzyme in *H. seropedicae* is unknown because this microorganism is not capable to grow in anaerobiosis using nitrate as the only nitrogen source. In addition to the nitrate reductases, this organism also contains genes that encode to putative nitrate transporters (*narK*, *narK₁U* e *nasFED*) and regulatory proteins (*nasR* e *narXL*). Some of these genes were studied before; however, the regulation and function of them in *H. seropedicae* are not completely understood. In order to understand how some of the genes related to nitrate metabolism are regulated and the roles of the nitrate reductases, it was used three approaches. First, total RNA from the *H. seropedicae* strain SmR1 grown on nitrate as the sole nitrogen source was extracted, depleted of rRNA and used for RNAseq transcriptional profiling on a platform SOLiD 4. The transcriptome of nitrate-grown cells was compared to that of *H. seropedicae* grown in the presence of ammonium. Out of 4804 genes, 1619 were differentially expressed, 377 of which were induced and 1242 repressed. The putative *narGHJI* operon were amongst the most upregulated genes. Genes encoding the putative assimilatory nitrate reductase were also induced. In the second approach, β -galactosidase assays were used to study the regulation of the *narXL*, *narK₁UGHJImoaA* and *nasFED* operons. The expression of *narXL* and *narK₁UGHJImoaA* operons was induced in low level of oxygen by Fnr, but the latter operon is also induced on nitrate. The expression of *nasFED* operon was induced on nitrate and on nitrogen-limiting condition by NtrB/NtrC and NtrY/NtrX. Finally, in the third approach, knockout strains containing in-frame mutant *nasA* and *narG* of *H. seropedicae* were constructed and characterized. When these strains were grown on nitrate as nitrogen source, the *narG*⁻ mutant showed a delay in growth whereas the *nasA*⁻ mutant was not able to grow. The results suggest that the assimilatory nitrate reductase is essential for assimilation of nitrate, but the role of the respiratory nitrate reductase is still unclear.

Key words: *Herbaspirillum seropedicae*. Nitrate metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – CICLO BIOGEOQUÍMICO DO NITROGÊNIO	16
FIGURA 2 – DESENHO ESQUEMÁTICO DA NITRATO REDUTASE RESPIRATÓRIA DE <i>E. coli</i>	20
FIGURA 3 – DESENHO ESQUEMÁTICO DAS NITRATO REDUTASES ASSIMILATÓRIAS	23
FIGURA 4 – MODELO DE REGULAÇÃO DE EXPRESSÃO DOS GENES ENVOLVIDOS COM A ASSIMILAÇÃO DE NITRATO DE <i>K. pneumoniae</i>	25
FIGURA 5 – GENES DE <i>H. seropedicae</i> ENVOLVIDOS COM O METABOLISMO DE NITRATO.....	27
FIGURA 6 – ANÁLISE DE INÍCIO DE TRANSCRIÇÃO	38
FIGURA 7 – ESTRATÉGIA UTILIZADA PARA OBTENÇÃO DOS MUTANTES <i>narG</i> ⁻ E <i>nasA</i> ⁻ DE <i>H. seropedicae</i>	42
FIGURA 8 – RNA TOTAL DE <i>H. seropedicae</i> SmR1 ANTES E APÓS DEPLEÇÃO DE rRNA.....	46
FIGURA 9 – COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES BIBLIOTECAS DE cDNA CONSTRUÍDAS	48
FIGURA 10 – DISTRIBUIÇÃO DE GENES COM TRANSCRIÇÃO DIFERENCIAL EM NITRATO EM RELAÇÃO À MAGNITUDE DE EXPRESSÃO	49
FIGURA 11 – DISTRIBUIÇÃO DE GENES COM TRANSCRIÇÃO DIFERENCIAL EM NITRATO EM RELAÇÃO À CATEGORIA (COG)	50
FIGURA 12 – VALORES DE RPKM DOS GENES DO OPERON <i>narK₁UGHJlmoaA</i>	52
FIGURA 13 – REGIÃO REGULATÓRIA DO OPERON <i>narXL</i> DE <i>H. seropedicae</i> , CONTIDA NO PLASMÍDEO pUC18-HS05099B08	58
FIGURA 14 – CONFIRMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pPW- <i>narXL</i> P/B	59
FIGURA 15 – PERFIL DE EXPRESSÃO DO OPERON <i>narXL</i> DE <i>H. seropedicae</i> SmR1 AO LONGO DO TEMPO	61
FIGURA 16 – PERFIL DE EXPRESSÃO DO OPERON <i>narXL</i> NA ESTIRPE SELVAGEM <i>H. seropedicae</i> SmR1 E ESTIRPES MUTANTES.....	63
FIGURA 17 – REGIÃO REGULATÓRIA DO OPERON <i>narK₁UGHJlmoaA</i> DE <i>H. seropedicae</i>	66
FIGURA 18 – CONFIRMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pMP- <i>narK₁U66</i>	67
FIGURA 19 – PERFIL DE EXPRESSÃO DO OPERON <i>narK₁UGHJlmoaA</i> DE <i>H. seropedicae</i> SmR1 AO LONGO DO TEMPO.....	67
FIGURA 20 – PERFIL DE EXPRESSÃO DO OPERON <i>narK₁UGHlmoaA</i> DE <i>H. seropedicae</i> SmR1 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OXIGÊNIO INICIAL	68

FIGURA 21 – PERFIL DE EXPRESSÃO DO OPERON <i>narK₁UGHJlmoaA</i> DE <i>H. seropedicae</i> SmR1 EM ESTIRPE SELVAGEM E ESTIRPES MUTANTES	70
FIGURA 22 – REGIÃO REGULATÓRIA DO OPERON <i>nasFED</i> DE <i>H. seropedicae</i>	72
FIGURA 23 – ESTRUTURA EM GRAMPO FORMADA PELO RNA DA REGIÃO PROMOTORA DO OPERON <i>nasFED</i> DE <i>H. seropedicae</i>	72
FIGURA 24 – CONFIRMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pMP- <i>nasFED</i>	73
FIGURA 25 – PERFIL DE EXPRESSÃO DO OPERON <i>nasFED</i> DE <i>H. seropedicae</i> SmR1 AO LONGO DO TEMPO	74
FIGURA 26 – PERFIL DE EXPRESSÃO DO OPERON <i>nasFED</i> DE <i>H. seropedicae</i> SmR1 EM ESTIRPE SELVAGEM E ESTIRPES MUTANTES	75
FIGURA 27 – CONFIRMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS pSUP- <i>narG-sacB</i> E pSUP- <i>nasA-sacB</i>	78
FIGURA 28 – CONFIRMAÇÃO DO MUTANTE <i>narG</i> ⁻	79
FIGURA 29 – CONFIRMAÇÃO DO MUTANTE <i>nasA</i> ⁻	80
FIGURA 30 – CONFIRMAÇÃO DO DUPLO MUTANTE <i>narGnasA</i> ⁻	81
FIGURA 32 – CURVA DE CRESCIMENTO DE ESTIRPE SELVAGEM E ESTIRPES MUTANTES <i>narG</i> ⁻ , <i>nasA</i> ⁻ E <i>narGnasA</i> ⁻ EM MICROAEROBIOSE	86
FIGURA 33 – CURVA DE CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA DE ESTIRPE SELVAGEM E ESTIRPES MUTANTES <i>narG</i> ⁻ , <i>nasA</i> ⁻ E <i>narGnasA</i> ⁻ EM MICROAEROBIOSE	87
FIGURA 34 – CURVA DE VIABILIDADE DE CÉLULAS DE ESTIRPE SELVAGEM E ESTIRPES MUTANTES <i>narG</i> ⁻ , <i>nasA</i> ⁻ E <i>narGnasA</i> ⁻ EM MICROAEROBIOSE	88
FIGURA 35 – REGULAÇÃO DOS GENES ENVOLVIDOS COM METABOLISMO DE NITRATO EM <i>H. seropedicae</i>	90
FIGURA 36 – MODELO PROPOSTO PARA O PAPEL DAS NITRATO REDUTASES, NITRITO REDUTASE E PRODUTO DO GENE <i>Hsero_2508</i> NO METABOLISMO DE NITRATO DE <i>H. seropedicae</i>	92

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESTIRPES DE BACTÉRIAS.....	30
TABELA 2 – PLASMÍDEOS	31
TABELA 3 – ANTIBIÓTICOS	33
TABELA 4 – BIBLIOTECAS DE cDNA CONSTRUÍDAS DE <i>H. seropedicae</i> CRESCENDO EM NITRATO E AMÔNIO.....	47
TABELA 5 – NÍVEL DE TRANSCRIÇÃO DIFERENCIAL EM NITRATO DOS GENES RELACIONADOS COM A NITRATO REDUTASE RESPIRATÓRIA.....	51
TABELA 6 – NÍVEL DE TRANSCRIÇÃO DIFERENCIAL EM NITRATO DOS GENES RELACIONADOS COM A NITRATO REDUTASE ASSIMILATÓRIA.....	53
TABELA 7 – NÍVEL DE TRANSCRIÇÃO DIFERENCIAL EM NITRATO DE GENES NÃO DIRETAMENTE ENVOLVIDOS COM O METABOLISMO DE NITRATO.....	56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS.....	14
1.1.1 Objetivo geral	14
1.1.2 Objetivos específicos	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	15
2.2 METABOLISMO DO NITROGÊNIO.....	15
2.2.1 Ciclo do nitrogênio.....	15
2.2.2 Regulação genética da fixação de nitrogênio.....	17
2.2.3 Metabolismo do nitrato	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 MICRORGANISMOS E PLASMÍDEOS	30
3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	32
3.2.1 Meios de cultura	32
3.2.2 Antibióticos	33
3.3 ESTOQUE	33
3.4 MANIPULAÇÃO DE DNA	34
3.4.1 Extração de DNA plasmidial.....	34
3.4.2 Eletroforese em gel de agarose	34
3.5 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO	34
3.5.1 Células eletrocompetentes.....	34
3.5.2 Transformação por eletroporação	35
3.6 CONJUGAÇÃO BACTERIANA.....	35
3.7 TRANSCRIPTOMA POR RNA-seq.....	35
3.7.1 Condição de cultivo e extração de RNA	35
3.7.2 Construção da biblioteca de cDNA e sequenciamento	36
3.7.3 Mapeamento e análise dos dados.....	36
3.8 ANÁLISES DE SEQUÊNCIA <i>in silico</i>	37
3.9 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DE <i>nasFED</i> POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	38
3.10 ENSAIO DE ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE	39
3.11 DOSAGEM DE PROTEÍNA	40
3.12 MUTAGÊNESE DOS GENES <i>nasA</i> E <i>narG</i> DE <i>H. seropedicae</i>	40
3.13 CURVAS DE CRESCIMENTO DE ESTIRPE SELVAGEM E ESTIRPES MUTANTES	43
3.14 DOSAGEM DE NITRITO	44
3.15 CONTAGEM DE BACTÉRIAS POR PLAQUEAMENTO	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 PERFIL GLOBAL DE EXPRESSÃO DE <i>H. seropedicae</i> NA PRESENÇA DE NITRATO ATRAVÉS DE TRANSCRIPTOMA POR RNA-seq	45
4.1.1 Extração de RNA, construção da biblioteca de cDNA e análise dos dados	45
4.1.2 Efeito do nitrato sobre o metabolismo global de <i>H. seropedicae</i>	49
4.1.3 Efeito do nitrato sobre a transcrição de genes envolvidos com o metabolismo do nitrato em <i>H. seropedicae</i>	50

4.1.4 Efeito do nitrato sobre a transcrição de genes não diretamente envolvidos com o metabolismo do nitrato em <i>H. seropedicae</i>	55
4.2 ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS COM METABOLISMO DE NITRATO DE <i>H. seropedicae</i> ATRAVÉS DE ENSAIOS DE B-GALACTOSIDASE.....	57
4.2.1 Operon <i>narXL</i>	57
4.2.2 Operon <i>narK₁UGHJlmoaA</i>	65
4.2.3 Operon <i>nasFED</i>	71
4.3 ANÁLISE FUNCIONAL DE NarG E NasA ATRAVÉS DE MUTAGÊNESE.....	77
4.3.1 Construção e confirmação dos mutantes <i>narG⁻</i> , <i>nasA⁻</i> e <i>narGnasA⁻</i>	77
4.3.2 Perfil de crescimento dos mutantes <i>narG⁻</i> , <i>nasA⁻</i> e <i>narGnasA⁻</i>	81
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
6 CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
ANEXOS	102

1 INTRODUÇÃO

Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria fixadora de nitrogênio endofítica que se associa com muitas gramíneas de interesse comercial, como milho, sorgo, cana de açúcar e arroz (BALDANI *et al.*, 1986; OLIVARES *et al.*, 1996). O metabolismo de nitrogênio de *H. seropedicae*, em particular a regulação da fixação de nitrogênio, tem sido alvo de vários estudos (revisto por CHUBATSU *et al.*, 2011). Contudo, o metabolismo de nitrato deste microrganismo ainda não foi bem explorado. Nitrato, que está presente em vários ambientes, é uma importante fonte de nitrogênio para muitas bactérias. Além disso, em vários microrganismos este composto é o aceptor final de elétrons preferido na ausência de oxigênio.

H. seropedicae apresenta vários genes envolvidos com o metabolismo de nitrato (PEDROSA *et al.*, 2011). Entre eles, encontram-se os genes *nasFED*, *narK*, *narK₁* e *narU*, que são homólogos a sistemas transportadores de nitrato. Desse modo, nitrato provavelmente entra na célula através destes transportadores para ser reduzido a nitrito por uma de duas nitrato redutases: a assimilatória ou a respiratória. Os genes *nasA* e *Hsero_2899* codificam para uma provável nitrato redutase assimilatória, que possivelmente reduz nitrato a nitrito no citoplasma. Os genes *narGHI* codificam para uma provável nitrato redutase respiratória. No entanto, *H. seropedicae* não é capaz de crescer em nitrato como fonte única de nitrogênio, em anaerobiose (BALDANI *et al.*, 1986). Com isso, o papel deste complexo enzimático neste microrganismo não é bem entendido. *H. seropedicae* também apresenta os genes *nasR* e *narXL*, cujos prováveis produtos apresentam similaridade com proteínas que, em outras bactérias, estão envolvidas com a regulação da nitrato redutase assimilatória e respiratória, respectivamente. O nitrito gerado por estas nitrato redutases pode então ser reduzido a amônio por uma provável nitrito redutase codificada pelos genes *nirBD*.

Já foi mostrado em estudos anteriores que vários destes genes de *H. seropedicae* são regulados pelas proteínas NtrC, NtrY e NarL (PERSUHN *et al.*, 2000; ALVES, 2006; OLIVEIRA, 2008). Apesar disso, a regulação deles ainda não é completamente entendida. Adicionalmente, o papel das nitrato redutases deste microrganismo também não é totalmente conhecido.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Estudar a regulação de genes envolvidos com o metabolismo do nitrato em *H. seropedicae* e melhor compreender os papéis dos genes que codificam para as prováveis nitrato redutases assimilatória e respiratória deste microrganismo.

1.1.2 Objetivos específicos

- Analisar o perfil global de transcrição de *H. seropedicae* na presença de nitrato.
- Estudar a regulação da região promotora dos prováveis operons *narXL*, *narK₁UGHJImoaA* e *nasFED* através de ensaios de β -galactosidase em *H. seropedicae* e estirpes mutantes (*Fnr⁻*, *ntrC⁻*, *ntrY⁻* e *narL⁻*).
- Obter estirpes de *H. seropedicae* mutantes para os genes *narG* e *nasA* que codificam para as subunidades catalíticas das nitratos redutases respiratória e assimilatória, respectivamente. Avaliar o fenótipo das estirpes *narG⁻*, *nasA⁻* e duplo mutante (*narGnasA⁻*) quanto a alterações no metabolismo de nitrogênio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae, bactéria gram-negativa membro da classe β -Proteobacteria, é um diazotrofo endofítico obrigatório que se associa não patogenicamente com a raiz e as partes aéreas de muitas gramíneas, como milho, sorgo, cana de açúcar e arroz (BALDANI *et al.*, 1986; OLIVARES *et al.*, 1996). Além disso, já foi isolado de plantas tropicais como bananeira e abacaxizeiro (MAGALHÃES CRUZ *et al.*, 2001).

Os primeiros isolados do gênero *Herbaspirillum* foram inicialmente descritos como sendo uma quarta espécie do gênero *Azospirillum* (BALDANI *et al.*, 1984). Entretanto, experimentos de hibridização RNA-RNA mostraram que estes isolados não têm relação próxima com os gêneros *Azospirillum* ou *Aquaspirillum* (FALK *et al.*, 1986). Com isso, foi definido a primeira espécie do novo gênero: *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI *et al.*, 1986).

As células deste microrganismo são vibrióides e, na presença de oxigênio, móveis. Em geral, apresentam dois flagelos polares. A temperatura e faixa de pH ótimos para crescimento dependente de nitrogênio gasoso é de 34°C e entre 5,3 e 8,0, respectivamente (BALDANI *et al.*, 1986; KLASSEN *et al.*, 1997).

H. seropedicae invade seus hospedeiros através de fendas nas junções das raízes laterais com a raiz principal. Após sua entrada, a bactéria coloniza os espaços intercelulares das raízes e se distribui para o córtex, células endodérmicas e vasos de xilema, através dos quais se difunde para toda a planta, inclusive para as partes aéreas (RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003).

2.2 METABOLISMO DO NITROGÊNIO

2.2.1 Ciclo do nitrogênio

O nitrogênio, um dos elementos químicos mais abundantes, é necessário para síntese de ácidos nucléicos e proteínas, dentre outras biomoléculas (CANFIELD *et al.*, 2010). Os principais processos do ciclo global do nitrogênio são realizados por bactérias e envolvem várias reações de óxido-redução.

O ciclo do nitrogênio se inicia com a fixação do nitrogênio, onde nitrogênio gasoso (N_2) é reduzido a amônia, através do complexo enzimático da nitrogenase. Os organismos que apresentam esta capacidade são chamados de diazotrofos, os quais se caracterizam pela sua capacidade de crescer tendo como única fonte o nitrogênio atmosférico (DIXON; KAHN, 2004). A amônia produzida pela fixação biológica do nitrogênio é convertida a amônio, o qual é incorporado a outras biomoléculas.

O amônio pode ser ainda convertido a nitrato durante o processo de nitrificação. Por outro lado, no processo de denitrificação, nitrato e nitrito são reduzidos via óxidos de nitrogênio a nitrogênio gasoso, o qual retorna a atmosfera (FIGURA 1) (RICHARDSON; WATMOUGH, 1999).

Os organismos que não são capazes de fixar nitrogênio incorporam nitrogênio diretamente do ambiente na forma de amônio ou através de redução de nitrato a amônio via redução assimilatória. Além disso, na ausência de oxigênio, o nitrato também pode ser usado como aceptor de elétrons na cadeia respiratória (CANFIELD *et al.*, 2010).

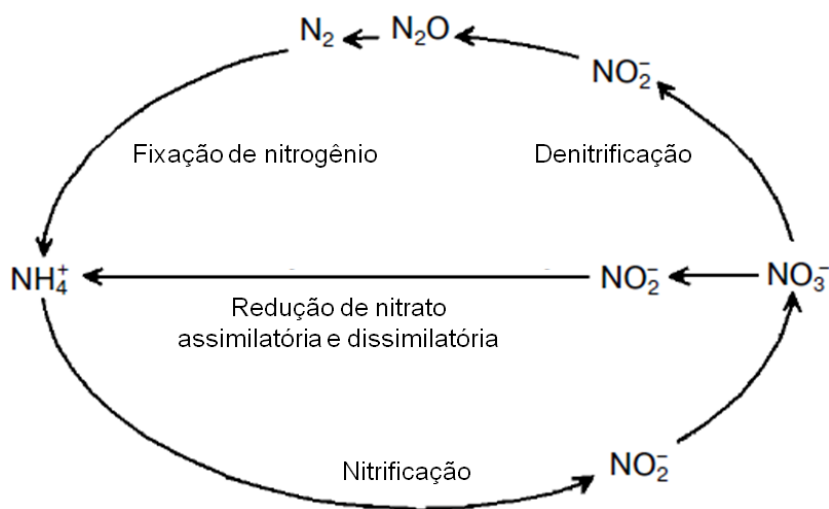


FIGURA 1 – CICLO BIOGEOQUÍMICO DO NITROGÊNIO

FONTE: Morozkina e Zvyagilskaya (2007).

2.2.2 Regulação genética da fixação de nitrogênio

Como a redução de nitrogênio atmosférico a amônia requer alto gasto energético, a fixação biológica de nitrogênio é fortemente regulada. Esta regulação ocorre principalmente a nível transcricional, tanto em resposta ao nível de oxigênio, o qual induz a inativação da nitrogenase, quanto ao nível de nitrogênio fixado disponível (DIXON; KAHN, 2004).

A transcrição dos genes responsáveis pela fixação de nitrogênio, genes *nif*, é dependente do fator sigma alternativo σ^{54} e da proteína NifA (DIXON; KAHN, 2004). A transcrição do gene *nifA* é geralmente dependente de uma cascata de proteínas regulatórias, conhecida como sistema regulatório de nitrogênio ou *ntr*. Em *E. coli*, o sistema *ntr* foi inicialmente descrito contendo seis proteínas: o sistema de dois componentes, NtrC e NtrB; a proteína PII, GlnB; e as enzimas GlnD, GlnE e glutamina sintetase (GS) (MERRICK; EDWARDS, 1995). Posteriormente, uma segunda proteína PII (GlnK) foi identificada em *E. coli* e outros microrganismos. Além disso, também foram identificadas em outras bactérias as proteínas NtrX e NtrY, as quais, como NtrC e NtrB, também são membros do sistema de dois componentes (PAWLOWSKI *et al.*, 1991).

Em *E. coli*, as proteínas PII (GlnB e GlnK) são sujeitas a modificação covalente catalisada por uma uridililtransferase, codificada pelo gene *glnD*. Sob condições de limitação de nitrogênio, a uridililtransferase uridilila GlnB e GlnK, as quais nesta forma não se ligam na proteína NtrB deixando-a livre para fosforilar a proteína reguladora de resposta, NtrC. Na forma fosforilada, NtrC interage com a RNA polimerase σ^{54} , ativando a transcrição de vários genes envolvidos com a fixação de nitrogênio e metabolismo de fontes alternativas de nitrogênio. Em altas concentrações de amônio, GlnB e GlnK são de-uridililadas, interagem com NtrB estimulando sua atividade de fosfatase e inativando NtrC pela remoção do fosfato (revisto por DIXON; KAHN, 2004).

Após a etapa de fixação biológica de nitrogênio, este deve ser incorporado em biomoléculas. Em enterobactérias, a via mais importante para a incorporação de nitrogênio é a glutamina sintetase/glutamato sintase (GS/GOGAT). A glutamina sintetase (GS), codificada pelo gene *glnA*, é uma enzima multimérica composta por 12 subunidades idênticas, que catalisa a conversão de glutamato e amônia em glutamina. Já a enzima glutamato sintase (GOGAT) converte uma glutamina em

duas moléculas de glutamato, através de adição de um grupo amina em α -cetoglutarato (MERRICK; EDWARDS, 1995).

A atividade da enzima glutamina sintetase é regulada através de adição de um grupo AMP em cada subunidade, o que torna a enzima inativa. Isto ocorre em resposta a altas concentrações de amônio intracelular (MERRICK; EDWARDS, 1995).

2.2.3 Metabolismo do nitrato

Como o nitrogênio é um fator limitante para o crescimento de plantas, é crescente o uso de fertilizantes nitrogenados na agricultura, especialmente na forma de nitratos. Entretanto, as consequências negativas da maior disponibilidade de nitrato e seus derivados no ambiente são muitas, desde eutrofização de sistemas aquáticos e terrestres, aumento do efeito estufa e redução na camada de ozônio. Com isso, o metabolismo de nitrato tem sido importante objeto de estudo nos últimos anos (ZUMFT, 1997; GRUBER; GALLOWAY, 2008). A principal forma de remoção do excesso de nitrogênio do ambiente, principalmente na forma de nitrato, é através das bactérias denitrificantes. O processo de denitrificação envolve a redução sucessiva de nitrato a nitrito e óxidos de nitrogênio (NO e N₂O), os quais são dissipados na atmosfera.

O primeiro passo para utilização de nitrato por organismos é sua redução a nitrito através das nitrato redutases. Quatro tipos de nitrato redutases catalizam a redução de dois elétrons de nitrato a nitrito ($\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$): a assimilatória eucariótica e três enzimas procarióticas (MORENO-VIVIÁN *et al.*, 1999).

Em plantas, o nitrato tem vários destinos dentro da célula: (1) estocagem no vacúolo, (2) transporte para fora da célula ou (3) transporte para outros órgãos através do xilema. Posteriormente, o nitrato pode ser assimilado através de redução a nitrito, pela nitrato redutase assimilatória eucariótica, e sucessiva (4) conversão para a amônio para ser incorporado em aminoácidos (CRAWFORD; GLASS, 1998).

Os procariotos, por outro lado, podem metabolizar o nitrato de três diferentes formas dependendo do tipo de nitrato redutase que cada espécie possui. Estas variam tanto em relação à localização celular, estrutura química e propriedades bioquímicas como também na organização e regulação gênica. A nitrato redutase

respiratória (NAR), associada à membrana, está envolvida na produção de energia metabólica. Esta enzima utiliza nitrato como aceptor final de elétrons, o que leva a geração de gradiente de prótons através da membrana e dirige a formação de ATP (respiração de nitrato). O nitrito originado pode ser reduzido tanto a amônio como a óxido nítrico, dependendo da espécie bacteriana. A nitrato redutase assimilatória citoplasmática (NAS) permite a utilização de nitrato como fonte de nitrogênio para crescimento (assimilação de nitrato), pois o nitrito gerado é posteriormente convertido a amônio. Já a nitrato redutase dissimilatória periplasmática (NAP) dissipa o excesso de energia redutora para manter o balanço redox (dissimilação de nitrato) (MORENO-VIVIÁN *et al.*, 1999; MOROZKINA; ZVYAGILSKAYA, 2007).

Em comum, as três diferentes nitrato redutases contêm como cofator dois grupos molibdopterina guanina dinucleotídeo (MGD) coordenados a um átomo de molibdênio (RICHARDSON *et al.*, 2001). Análises de genomas de procariotos mostram que essas três enzimas são filogeneticamente muito difundidas. Entretanto, nem sempre as três nitrato redutases estão presentes em uma mesma bactéria. O endofítico *H. seropedicae*, por exemplo, apresenta em seu genoma prováveis genes que codificam para duas delas: a nitrato redutase respiratória e a nitrato redutase assimilatória (PEDROSA *et al.*, 2011). Além disso, quando presentes de forma simultânea, a redução de nitrato tanto através da nitrato redutase respiratória como da nitrato redutase assimilatória são totalmente independentes tanto na regulação como em função (BONNEFOY; DEMOSS, 1994).

2.2.3.1 Nitrato redutase respiratória

A redução de nitrato através da nitrato redutase respiratória, associada à membrana plasmática, está acoplada com a geração de um gradiente de prótons através da membrana, o que dirige a formação de ATP através da ATPase F_1F_0 (PHILIPPOT; HOJBERG, 1999).

A nitrato redutase NarGHI é bem difundida entre as enterobactérias e foi bem caracterizada, principalmente em *Escherichia coli*. A estrutura desta enzima consiste em um heterotrímero composto pelas subunidades citoplasmáticas α e β e pela subunidade transmembrana, γ . A subunidade catalítica α (139kDa), codificada pelo gene *narG*, contém um cluster [4S-4Fe] e um cofator molibdopterina (Mo-bisMGD) que é o sítio de redução de nitrato. O gene *narH* codifica para a

subunidade β (58 kDa), uma proteína globular que contém três clusters $[4\text{Fe-4S}]$ e um cluster $[3\text{Fe-4S}]$. Já a subunidade γ (26 kDa), codificada pelo gene *narI*, apresenta cinco hélices transmembrana, dois grupos hemes (b_P e b_D) e o 'sítio-Q', onde quinol se liga e é oxidado. NarI ancora NarGH no lado citoplasmático da membrana celular (FIGURA 2) (BLASCO *et al.*, 2001; BERTERO *et al.*, 2003). O produto do gene *narJ* (NarJ) atua como uma chaperona específica requerida para inserção do cofator Mo-bisMGD em NarG (LIU; DEMOSS, 1997; BLASCO *et al.*, 1998).

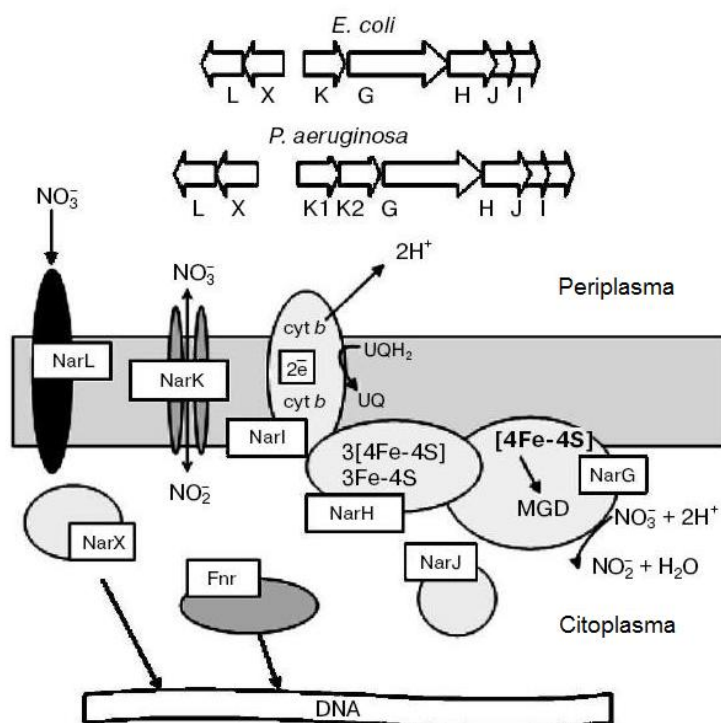


FIGURA 2 – DESENHO ESQUEMÁTICO DA NITRATO REDUTASE RESPIRATÓRIA DE *E. coli*

A parte superior da figura ilustra a organização dos genes estruturais e regulatórios das nitrato redutases respiratórias de *E. coli* e *P. aeruginosa*. FONTE: Morozkina e Zvyagilskaya (2007).

Tanto ubiquinol como menaquinol podem ser utilizados como doadores fisiológicos de elétrons para NarGHI. Após a oxidação do quinol no sítio-Q, os elétrons são transferidos dos grupos heme da subunidade γ para os grupos Fe-S da subunidade β . Esta, por sua vez, transfere os elétrons para o sítio catalítico da subunidade α , onde nitrato será reduzido. A oxidação do quinol no lado

periplasmático da membrana interna e o lançamento de dois prótons no compartimento periplasmático leva a formação de um gradiente de prótons transmembrana, que dirige a formação de ATP (PHILIPPOT; HOJBERG, 1999; BERTERO *et al.*, 2003).

Como o sítio ativo de NarGHI (subunidade α) está localizado no citoplasma, o nitrato deve ser transportado para dentro da célula para ser reduzido. Esta função é desempenhada por NarK, uma proteína transmembrana membro da superfamília dos facilitadores principais (MFS). Os membros desta família caracterizam-se por serem polipeptídeos únicos, os quais transportam pequenas moléculas em resposta ao gradiente químiosmótico. Análises genéticas e fisiológicas revelam que as proteínas NarK podem ser divididas em dois tipos. Os membros do tipo 1 realizam antiporte nitrato/nitrito e simporte nitrato/próton e os do tipo 2 estão envolvidos no transporte de nitrito (MARGER; SAIER, 1993; PAO *et al.*, 1998; MOIR; WOOD, 2001).

De modo geral, os genes relacionados com a nitrato redutase respiratória são: *narGHJI*, *narK*, *narXL*, *narP* e *narQ*. Em *E. coli*, o gene *narK* está situado à montante dos genes que codificam para a nitrato redutase respiratória (*narKGHJI*). À montante de *narK* são encontrados os genes que codificam para o sistema de dois componentes NarXL (*narXL*). Em duas outras regiões do genoma, também estão presentes os genes *narP* e *narQ*, outro par regulatório da família de dois componentes.

A regulação por nitrato e nitrito é realizada pelas proteínas sensoras NarX e NarQ, e as proteínas de resposta, NarL e NarP. A proteína NarQ, é estimulada tanto por nitrito quanto por nitrato e fosforila tanto NarL como NarP. Já a proteína NarX é estimulada apenas por nitrato e fosforila preferencialmente NarL. Com isso, NarX parece ser requerida para discriminar entre nitrato e nitrito (STEWART; BLEDSOE, 2003; NORIEGA *et al.*, 2010). As proteínas NarP e NarL reconhecem os mesmos sítios de ligação ao DNA, mas interagem com este com afinidades diferentes. Além disso, NarL é capaz de se ligar em sítios adicionais, que não são reconhecidos por NarP (DARWIN *et al.*, 1997). Este sistema de *cross-talk* permite uma regulação fina em resposta aos níveis de nitrato intracelulares.

Em *E. coli*, a região intergênica entre *narK* e *narXL* (FIGURA 2) com cerca de 300 pares de base, contém as regiões controladoras dos dois operons, as quais podem se sobrepor, especialmente porque o padrão de regulação de ambos é muito

semelhante. Tanto o gene *narK* como *narX* são fortemente induzidos em resposta a nitrato/nitrito e anaerobiose. Por outro lado, tanto molibdato, via proteína ModE, quanto as proteínas NarL e NarP são requeridos para indução por nitrato/nitrito do operon *narXL*. Já a proteína FNR, que atua na regulação de genes alvo em resposta a oxigênio, parece ativar apenas o promotor de *narK* (DARWIN; STEWART 1995; SELF *et al.*, 1999). À montante de *narG*, também há um promotor, cuja expressão ocorre em níveis máximos na presença de nitrato e baixa oxigenação. A atividade dele é dependente de Fnr, NarXL e IHF (SCHRODER *et al.*, 1993).

E. coli apresenta outra nitrato redutase ligada à membrana: a NarZYV, que apresenta propriedades muito semelhantes à NarGHI. Entretanto, NarZYV é expressa em níveis muito baixos e de modo independente de oxigênio (FNR) e nitrato/nitrito, estando presente nas células apenas em níveis basais. Essa expressão constitutiva sugere que NarZYV poderia auxiliar a bactéria na transição do metabolismo aeróbio para o anaeróbio (IOBBI *et al.*, 1987; MORENO-VIVIÁN, *et al.*, 1999; PHILIPPOT; HOJBERG, 1999).

Diferente de *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* apresenta dois genes *narK* (FIGURA 2), *narK₁* e *narK₂*, ambos à montante dos genes estruturais de NarGHI constituindo o operon *narK₁K₂GHJI*. A expressão deste operon é induzida por Anr (proteína homóloga a Fnr de *E. coli*) e NarXL em resposta a anaerobiose e nitrato, respectivamente. O operon *narXL* é levemente induzido por nitrato e anaerobiose, mas não sofre autoregulação. A transcrição deste operon é induzida por Anr, mas é influenciada pela proteína IHF (SCHREIBER *et al.*, 2007)

2.2.3.2 Nitrato redutase assimilatória

Ao contrário da redução dissimilatória de nitrato, que apenas ocorre em bactérias, a redução assimilatória ocorre em vários eucariotos (plantas e fungos) e procariotos (BONNEFOY; DEMOSS, 1994).

O nitrato deve ser transportado para dentro da célula através de transportadores específicos para então ser reduzido a amônio por enzimas citoplasmáticas. O amônio é convertido em formas metabolizáveis pela célula através das enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase (MORENO-VIVIÁN *et al.*, 1999; RICHARDSON *et al.*, 2001).

Baseado na estrutura do cofator que atua como doador de elétrons é possível distinguir dois tipos de nitrato redutase assimilatória: NAS dependente de NADH e NAS dependente de ferredoxina/flavodoxina. Ambos os tipos contêm um *cluster* ferro-enxofre N-terminal, mas não possuem grupos heme (MORENO-VIVIÁN *et al.*, 1999; MOROZKINA; ZVYAGILSKAYA, 2007).

NAS dependente do cofator NADH

Em *K. oxytoca* (*K. pneumoniae* M5al), membro da família *Enterobacteriaceae*, os genes estruturais da nitrato redutase responsável pela assimilação de nitrato são codificados pelos genes *nasCBA*. A nitrato redutase assimilatória é um heterodímero constituído pelo produto dos genes *nasA* (NasA) e *nasC* (NasC). Presume-se que NasA (92 kDa) contém o sítio catalítico (Mo-bisMGD), um cluster [4Fe-4S] na extremidade N-terminal e um cluster [2Fe-2S]. A proteína NasC (43kDa) parece ligar-se ao cofator FAD e transferir elétrons de NAD(P)H para a subunidade catalítica, NasA. Já NasB (104kDa) é uma nitrito redutase siro-heme (FIGURA 3) (LIN *et al.*, 1993; 1994). Dessa forma, a ação conjunta de NasABC converte nitrato em amônio, que pode ser incorporado nas biomoléculas.

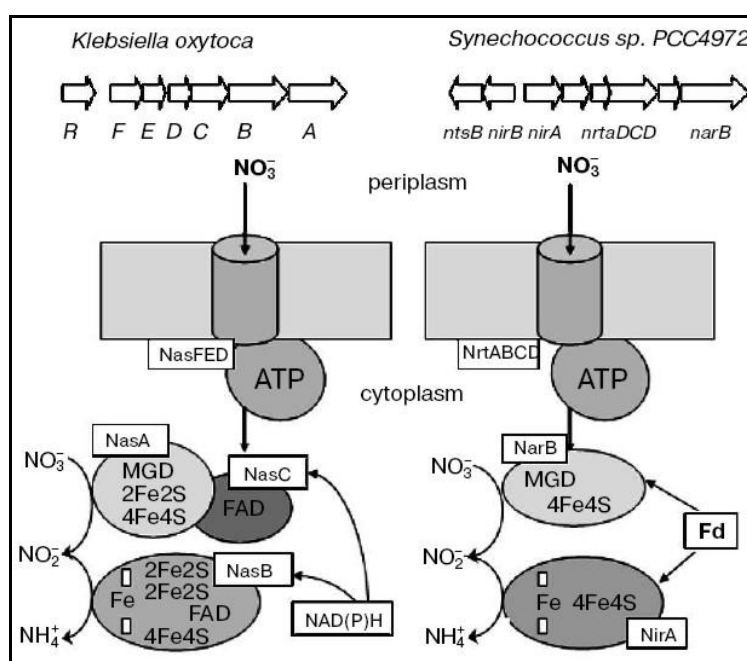


FIGURA 3 – DESENHO ESQUEMÁTICO DAS NITRATO REDUTASES ASSIMILATÓRIAS

A nitrato redutase de *K. oxytoca* é dependente de NADH e a de PCC4972, é dependente de flavodoxina. Na parte superior da figura são mostrados esquemas da organização dos genes da nitrato redutase assimilatória destes dois microrganismos. FONTE: Morozkina e Zvyagilskaya (2007).

Em *K. pneumoniae*, os genes *nasCBA* fazem parte do operon *nasFEDCBA* que localiza-se à jusante do gene *nasR*. O gene *nasR*, que não faz parte deste mesmo operon, codifica para uma proteína que regula transcrição através de anti-terminação (GOLDMAN *et al.*, 1994). Os genes *nasFED* codificam para um transportador de nitrato e de nitrito, membro do sistema de transportadores do tipo ABC (ATP-binding cassette), os quais acoplam a energia liberada pela hidrólise do ATP para catalisar o transporte de compostos para dentro ou para fora de organelas e células (DAVIDSON; CHEN, 2004). NasF (46 kDa) é uma proteína periplasmática, enquanto que NasE (32 kDa) parece ser acoplada à membrana uma vez que possui domínios transmembrana. Provavelmente esta proteína se estende através da membrana plasmática, na forma de homodímero. NasD (29 kDa) é uma ATPase associada à membrana (WU; STEWART, 1998).

O operon *nasFEDCBA* de *K. pneumoniae* está sujeito a dois níveis de regulação: indução na ausência de amônio, via sistema geral de regulação de nitrogênio (Ntr) e indução por nitrato e nitrito (FIGURA 4). Na ausência destes dois últimos compostos, um grampo terminador de transcrição presente na região líder do transcrito do gene *nasF* previne a transcrição dos genes do operon. Quando nitrato e nitrito estão presentes, NasR interage com estes e liga-se ao RNA nascente de *nasF*, interrompendo a formação do grampo terminador e, desta forma, aumentando a expressão do operon (LIN; STEWART, 1996; CHAI; STEWART, 1998; 1999; WU *et al.*, 1999). Por outro lado, o sistema Ntr controla a expressão de *nasFEDCBA* através da proteína NtrC, tanto diretamente, quanto indiretamente, via NasR. A região promotora deste operon apresenta dois sítios de ligação funcionais para NtrC e um para o fator σ^{54} (LIN; STEWART, 1996). No controle indireto, o gene *nasR*, que está localizado imediatamente à montante de *nasF*, apresenta em sua região regulatória, um provável sítio de ligação para σ^{54} , mas sítios para NtrC não são aparentes. Apesar disso, foi demonstrado *in vitro* que NtrC é o ativador da expressão de *nasR* (GOLDMAN *et al.*, 1994; WU *et al.*, 1999).

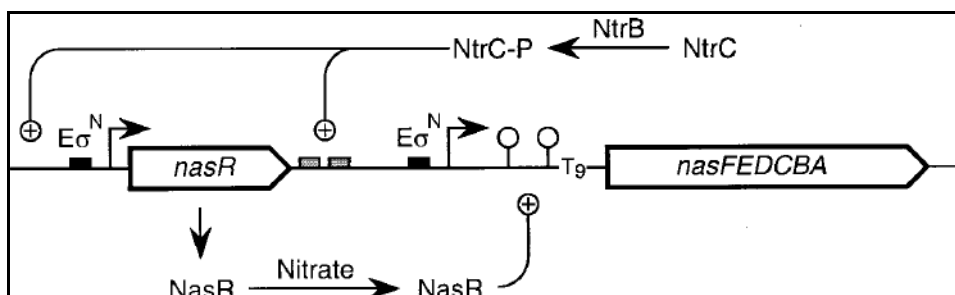


FIGURA 4 – MODELO DE REGULAÇÃO DE EXPRESSÃO DOS GENES ENVOLVIDOS COM A ASSIMILAÇÃO DE NITRATO DE *K. pneumoniae*

Os retângulos em preto representam os sítios reconhecidos pela RNA polimerase σ^{54} ($E\sigma^N$). Os sítios de ligação para NtrC estão indicados por retângulos sombreados. As setas indicam o início de transcrição. FONTE: Wu e colaboradores (1999).

NAS dependente do cofator ferredoxina/flavodoxina

As nitrato redutases assimilatórias dependentes de ferredoxina/flavodoxina apresentam em seu núcleo ativo centros [Fe-S], mas são desprovidas de FAD e citocromos (RUBIO *et al.*, 1999). Elas apresentam algumas diferenças em relação às NAS dependentes de NADH de outras bactérias. Em *Azotobacter vinelandii* e *Plectonema boryanum*, NAS consiste em uma subunidade única com um centro [4Fe-4S] e utiliza flavodoxina como doadora de elétrons (MIKAMI; IDA, 1984). Em cianobactérias, as nitrato redutases atuam como monômeros, apresentam cerca de 80kDa, são parcialmente associadas à membrana do tilacóide e podem utilizar ferredoxina ou flavodoxina reduzidas através da fotossíntese como doadores de elétrons. As nitrito redutases de cianobactérias também utilizam ferredoxina ou flavodoxinas fotossintéticas como doadoras de elétrons (FLORES *et al.*, 2005).

Na cianobactéria *Synechococcus* sp. PCC7942, os genes envolvidos na assimilação de nitrato estão contidos no operon *nirAnrtABCDnarB*. NirA codifica para a nitrito redutase, enquanto que NarB funciona como nitrato redutase. O transporte de nitrato e nitrito é realizado pelo sistema de transporte de multicomponentes do tipo ABC codificado pelos genes *nrtABCD* (NrtABCD). NrtA é uma lipoproteína ancorada à membrana plasmática que liga-se a nitrato/nitrito com alta afinidade. NrtB apresenta pelo menos cinco segmentos hidrofóbicos que possivelmente atravessam a membrana, indicando que é uma proteína integral. NrtD apresenta domínio de ligação a ATP, típico dos transportadores do tipo ABC. NrtC parece ser uma fusão de NtrA e NtrD; no domínio N-terminal, com 58% de

identidade com NtrD, apresenta motivos de ligação a ATP enquanto que o C-terminal é similar à NtrA (OMATA, 1995; FLORES *et al.*, 2005).

Na cianobactérias já estudadas não foram encontradas sequências de DNA homólogas aos genes *ntrB* ou *ntrC*. Ao invés disso, a proteína NtcA, componente da família CRP (CAP) de reguladores transcricionais, regula os genes envolvidos com a assimilação de nitrogênio através de ligação à sequência consenso GTA-N₈-TAC (LUQUE *et al.*, 1994).

A região promotora do operon *nirAnrtABCDnarB* apresenta vários sítios de ligação para NtcA e também para NtcB, outro regulador de transcrição, porém membro da família LysR de reguladores transcricionais. NtcB ativa a transcrição do operon na presença de nitrito. Além disso, a proteína NirB, a qual não apresenta similaridade com proteínas conhecidas, parece ser requerida para expressão máxima da nitrito redutase (SUZUKI *et al.*, 1995). As proteínas NtcB e NirB são codificadas pelos genes contidos no operon *nirBntcB*, localizado à montante do operon *nirAnrtABCDnarB*, mas transcrito na direção oposta à este (LUQUE *et al.*, 1994).

2.2.3.3 Nitrato redutase periplasmática

Localizada no periplasma na forma de heterodímeros, a nitrato redutase periplasmática de *Escherichia coli* é codificada pelo operon *napFEAGHBC*. O nitrito gerado pela NAP pode ser utilizado como fonte de nitrogênio ou como substrato para respiração anaeróbica de acordo com o organismo, embora essas funções não pareçam ser a sua função primária (MORENO-VIVIÁN *et al.*, 1999).

Acredita-se que a redução de nitrato através desta enzima tem um papel importante na denitrificação aeróbia em *Pseudomonas* sp. e *Paracoccus pantotrophus*, na adaptação ao crescimento sob condições de anaerobiose em *Ralstonia eutropha*, na manutenção do equilíbrio redox sob uso de nitrato como aceptor de elétrons para remoção de energia redutora em *Thiosphaerovou*, dentre outras funções (MOROZKINA; ZVYAGILSKAYA, 2007). Outros organismos que também apresentam genes *nap* são *Azoarcus* sp. BH72, *Sinorhizobium meliloti*, e *Rhodobacter sphaeroides*.

2.2.3.4 Genes de *H. seropedicae* envolvidos com o metabolismo de nitrato

Em *H. seropedicae*, foram identificados 18 genes que provavelmente codificam para proteínas estruturais ou regulatórias envolvidas no metabolismo de nitrato, os quais estão distribuídos em quatro regiões diferentes do genoma deste microrganismo (FIGURA 5). Destes genes, dez estão relacionados com uma provável nitrato redutase respiratória, seis com uma provável nitrato redutase assimilatória e dois com uma provável nitrito redutase (PEDROSA *et al.*, 2011).

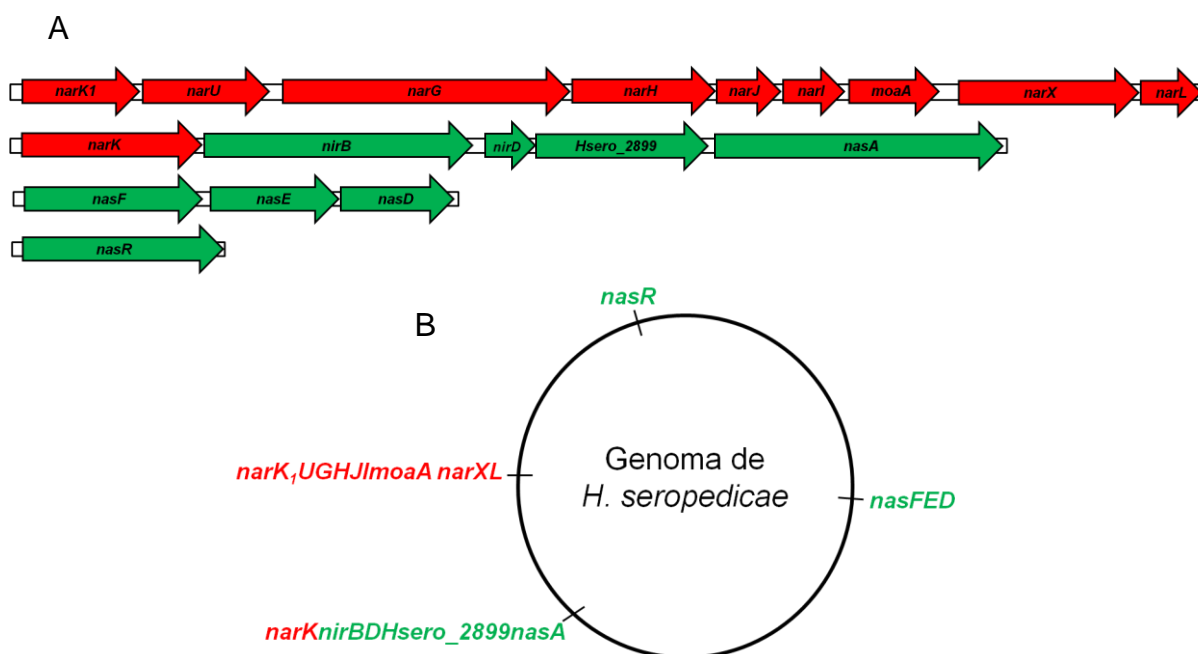


FIGURA 5 – GENES DE *H. seropedicae* ENVOLVIDOS COM O METABOLISMO DE NITRATO

(A) Em verde, os genes relacionados à nitrato redutase assimilatória e nitrito redutase; em vermelho, os relacionados à nitrato redutase respiratória. (B) Representação esquemática da localização destes genes no genoma de *H. seropedicae*. FONTE: O Autor.

Dois genes para prováveis transportadores de nitrato (*narK₁* e *narU*) estão localizados à montante dos genes estruturais da provável nitrato redutase respiratória (*narGHJI*). À jusante de *narI*, é encontrado o gene *moaA*, que possivelmente codifica para uma enzima que sintetiza o cofator MGD, cofator das nitrato redutases, constituindo o provável operon *narK₁UGHJImoaA*. Os genes do provável operon *narXL*, localizado à jusante de *moaA*, apresentam similaridade com proteínas regulatórias, membros do sistema de dois componentes. Apesar de *H.*

seropedicae apresentar genes com alta similaridade a nitrato redutase respiratória, esta bactéria não é capaz de crescer em anaerobiose em nitrato como única fonte de nitrogênio (BALDANI *et al.*, 1986).

O gene para o terceiro transportador de nitrato (*narK*) está situado à montante de *nirB* e *nirD*, os quais apresentam alta identidade com nitrito redutases. À justante de *nirD* são encontrados outros dois genes: *Hsero_2899* e *nasA*. Provavelmente, o gene *nasA* codifica para a subunidade maior da nitrato redutase assimilatória, enquanto que *Hsero_2899* apresenta similaridade com o gene *nasC*, que em organismos relacionados codifica para a subunidade menor desta enzima. É provável que em *H. seropedicae*, o nitrato seja principalmente metabolizado através da nitrato redutase assimilatória. Os genes *nasA* e *Hsero_2899*, em conjunto com os genes que codificam para NarK e para as nitrito redutases, possivelmente constituem o operon *narKnirBDHsero_2899nasA*.

H. seropedicae apresenta também um quarto sistema de transporte de nitrato, codificado pelos genes do operon *nasFED*. Além disso, em uma quarta região do genoma, este organismo apresenta o gene *nasR*, que codifica para uma proteína anti-terminadora de transcrição.

A regulação da expressão de alguns destes operons de *H. seropedicae* já foi estudada. A expressão do operon *narXL* não é influenciada por oxigênio ou molibdênio, enquanto que a expressão de *narKnirBDHsero_2899nasA* é induzida por nitrato. As proteínas NtrY e NtrC são requeridas para total atividade destes dois operons (ALVES, 2006; MIGUEL, 2011). Análises de quantificação de expressão por RT-PCR mostraram que os genes *narU* e *narG* são induzidos mais de 100 vezes por nitrato. Já os genes *narK*, *nirD*, *nasA* e *nasF* têm sua expressão induzida em mais de 40 vezes em DO₆₀₀ de 0,5, mas esses níveis caem para cerca de três vezes em DO₆₀₀ de 1,0. Já a expressão dos genes *narX* e *nasR* são levemente induzidos em DO₆₀₀ 0,5, mas os níveis aumentam para maior que cinco vezes em DO₆₀₀ 1,0 (GUIMARÃES, 2011).

Foi observado que mutantes *ntrC*⁻, *ntrY*⁻ e *narL*⁻ de *H. seropedicae* não são capazes de crescer em nitrato como única fonte de nitrogênio (PERSUHN *et al.*, 2000; ALVES, 2004; 2006; OLIVEIRA, 2008). Isso sugere que as proteínas regulatórias membros do sistema de dois componentes NtrB/NtrC, NtrY/NtrX e NarX/NarL devem desempenhar um papel chave na regulação de genes envolvidos

com o metabolismo de nitrato, o que já foi previamente observado nos ensaios de β -galactosidase citados anteriormente.

Ao contrário de *E. coli*, *H. seropedicae* não apresenta em seu genoma os genes que codificam para as proteínas membro do sistema de dois componentes, NarP e NarQ. Além disso, os genes estruturais da nitrato redutase NarZYV também não estão presentes. Assim como os procariotos *Azorhizobium caulinodans*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Burkholderia pseudomallei* e *Pantoea ananatis*, *H. seropedicae* também não apresenta os genes *nap*, que estão envolvidos com a nitrato redutase periplasmática.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS E PLASMÍDEOS

As estirpes de bactérias e os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

TABELA 1 – ESTIRPES DE BACTÉRIAS

Estirpe	Genótipo	Referência
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ ⁻ <i>rpsL nupG</i>	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> S17.1	Tra ⁺ , (Sm ^R)	(SIMON <i>et al.</i> , 1983)
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Sm ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1	Estirpe selvagem, Nif ⁺ , (Sm ^R)	(SOUZA <i>et al.</i> , 2000)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> MBFNR2/3/1 (Fnr⁻)	<i>fnr</i> ₁ ⁻ , <i>fnr</i> ₂ ⁻ e <i>fnr</i> ₃ ⁻ (Sm ^R)	(BATISTA, 2011)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> DCP286A (<i>ntrC</i>⁻)	<i>ntrC</i> ⁻ , Nif ⁻ , (Sm ^R , Km ^R)	(PERSUHN <i>et al.</i> , 2000)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> A01 (<i>ntrY</i>⁻)	<i>ntrY</i> ⁻ , Nif ⁺ , (Sm ^R , Km ^R)	(ALVES, 2004; 2006)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> LT78 (<i>narL</i>⁻)	<i>narL</i> ⁻ , Nif ⁺ , (Sm ^R , Km ^R)	(OLIVEIRA, 2008)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> (<i>narG</i>⁻)	<i>narG</i> ⁻ (Sm ^R)	Este trabalho
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> (<i>nasA</i>⁻)	<i>nasA</i> ⁻ (Sm ^R)	Este trabalho
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> (<i>narGnasA</i>⁻)	<i>narG</i> ⁻ , <i>nasA</i> ⁻ (Sm ^R)	Este trabalho

TABELA 2 – PLASMÍDEOS

Plasmídeos	Características	Referência
pCR2.1-TOPO	Vetor de clonagem (Amp ^R , Km ^R)	Invitrogen
pCR2.1- <i>narK₁K₂</i> (<i>int</i>)	Fragmento de 724 pb contendo a região promotora do operon <i>narK₁U</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado no vetor pCR2.1-TOPO (Amp ^R , Km ^R)	(OSAKI, 2009)
pMH1701	Contém o cassete <i>sacB</i> -Km (Km ^R)	(HYNES <i>et al.</i> , 1989)
pMP220	Contém o gene repórter <i>lacZ</i> (Tc ^R)	(SPAINK, Okker <i>et al.</i> , 1987)
pMP- <i>narK₁narU</i>	Fragmento <i>Bgl</i> I/ <i>Pst</i> I de 711 pb contendo a região promotora do operon <i>narK₁U</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado no vetor pMP220 entre os sítios de restrição <i>Bgl</i> I e <i>Pst</i> I (Tc ^R)	Este trabalho
pPW452	Contém o gene repórter <i>lacZ</i> (Tc ^R)	(WOODLEY <i>et al.</i> , 1996)
pPW-B08 P/B	Fragmento <i>Pst</i> I/ <i>Bgl</i> I de 721 pb contendo a região promotora do operon <i>narXL</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado no vetor pPW452 entre os sítios de restrição <i>Pst</i> I/ <i>Bgl</i> I	Este trabalho
pSUP202	(Amp ^R , Cm ^R , Tc ^R)	(SIMON <i>et al.</i> , 1983)
pSUP- <i>narG</i>	Fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I de 1,1 Kb, que contém a região <i>narG</i> UP fusionada à <i>narG</i> DOWN, clonado no vetor pSUP202 entre os sítios de restrição <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	Este trabalho
pSUP- <i>narG-sacB</i>	Fragmento <i>Bam</i> HI de <i>sacB</i> -Km clonado no plasmídeo pSUP- <i>narG</i> digerido com <i>Bam</i> HI	Este trabalho
pSUP- <i>nasA</i>	Fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I de 1,2 Kb, que contém a região <i>nasA</i> UP fusionada à <i>nasA</i> DOWN, clonado no vetor pSUP202 entre os sítios de restrição <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	Este trabalho
pSUP- <i>nasA-sacB</i>	Fragmento <i>Bam</i> HI de <i>sacB</i> -Km clonado no plasmídeo pSUP- <i>nasA</i> digerido com <i>Bam</i> HI	Este trabalho
pTZ57R/T	Vetor de clonagem (Amp ^R)	Fermentas
pTZ-B08 rev/rev	Fragmento de 943 pb originado a partir do plasmídeo pUC18-HS05099B08 contendo a região promotora do operon <i>narXL</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado no vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pUC18-HS05099B08	Clone da biblioteca aleatória de DNA de <i>H. seropedicae</i> contendo a região promotora do operon <i>narXL</i> clonado no vetor pUC18	GENOPAR

3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

3.2.1 Meios de cultura

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas nos meios de cultura descritos abaixo, a 37°C, sob agitação.

• **LB** (Luria Bertani) (SAMBROOK *et al.*, 1989)

Composição	gramas/litro
extrato de levedura	5,0
NaCl	10,0
triptona	10,0

Para o preparo do meio LA (Luria-ágar) foi adicionado 1,5% de ágar no meio LB.

• **SOB** (GIBCO-BRL)

Composição	gramas/litro
triptona	20,0
extrato de levedura	5,0
NaCl	0,584
KCl	0,186

As estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas no meio NFb-malato (pH 6,5) descrito abaixo, a 30°C e sob agitação de 120 rpm.

• **NFb-malato** (KLASSEN *et al.*, 1997)

Composição	gramas/litro
MgSO ₄	2×10^{-1}
NaCl	1×10^{-1}
CaCl ₂	2×10^{-2}
Acido nitrilo-triacético	$5,6 \times 10^{-2}$
FeSO ₄	2×10^{-2}
Malato de sódio	5
Biotina	1×10^{-4}
Na ₂ MoO ₄	2×10^{-3}
MnSO ₄	$2,35 \times 10^{-3}$
H ₃ BO ₃	$2,8 \times 10^{-3}$
CuSO ₄	8×10^{-5}
ZnSO ₄	$2,4 \times 10^{-4}$

A mistura de fosfatos (159,5 g/L de KH_2PO_4 e 17,8 g/L de K_2HPO_4) foi autoclavada e adicionada separadamente ao meio em uma proporção de 50 mL para 1 litro volume final. Como fonte de nitrogênio foi utilizado NH_4Cl 20 mM. Para o preparo de NFb-malato sólido ou semi-sólido foi adicionado 1,5% ou 0,175% de ágar no meio NFb-malato líquido, respectivamente. Além disso, aos meios sólido e semi-sólido foi adicionado 10% da mistura de fosfatos com o intuito de tamponar o pH do meio NFb, para evitar a hidrólise do ágar durante a autoclavação.

Todos os meios de cultura listados acima foram esterilizados por autoclavação (a 120°C, a uma atmosfera de pressão, durante 20 minutos).

3.2.2 Antibióticos

Os antibióticos utilizados estão listados na tabela 3. As soluções estoque foram preparadas conforme Sambrook e colaboradores (1989) e armazenados a -20°C.

TABELA 3 – ANTIBIÓTICOS

Antibiótico	Concentração estoque (mg/mL)	Concentração final (µg/mL) <i>E. coli</i>	Concentração final (µg/mL) <i>H. seropedicae</i>
Ácido Nalidíxico (Nal)	10	-	5
Ampicilina (Amp)	250	250	-
Canamicina (Km)	100	50	500
Cloranfenicol (Cm)	30	30	-
Streptomicina (Sm)	80	10	80
Tetraciclina (Tc)	10	10	10

3.3 ESTOQUE

As estirpes de *E. coli* foram mantidas em glicerol 50% a uma temperatura de -20°C. Já as estirpes de *H. seropedicae* foram estocadas em meio NFb-malato semi-sólido, a temperatura ambiente.

3.4 MANIPULAÇÃO DE DNA

3.4.1 Extração de DNA plasmidial

Alíquotas de 1,5 mL de células de *E. coli* saturadas foram coletadas e centrifugadas a 14000 x g por um minuto. O sedimento foi ressuspensão com a adição de 150 µL de GET (glucose 50 mM, EDTA 10 mM; Tris HCl pH 8,0 25 mM). Para lise das células, foi acrescentado 150 µL de solução de lise (SDS 1%, NaOH 0,18 M), e, para neutralização do pH, 150 µL de KacF (acetato de Potássio 3 M, ácido fórmico 1,8 M, pH 4,8). Após a incubação das células por 5 minutos no gelo, foi adicionado 50 µL de fenol:clorofórmio:isoamílico (25:24:1). A mistura foi homogeneizada e centrifugada por sete minutos a 14000 x g. Em seguida, foi coletado 450 µL do sobrenadante, que foi transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado com etanol, seco e ressuspensão em 20 µL de água ultra pura autoclavada.

3.4.2 Eletroforese em gel de agarose

Para análise dos fragmentos de DNA foram utilizados géis de agarose em concentrações variando de 1 a 2%, em tampão TBE 1x (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM) ou TAE (Tris-acetato pH 8,3 40 mM, EDTA 1 mM) Os géis foram corados com brometo de etídio 0,5 µg/mL e visualizados em transluminador de luz ultravioleta.

3.5 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO

3.5.1 Células eletrocompetentes

Estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio SOB, a 37°C, sob agitação. Quando atingido D.O.₆₀₀ entre 0,4 e 0,6 (Espectrofotômetro Pharmacia LKB Ultrospec III) a cultura foi centrifugada a 14000 x g, por cinco minutos, a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas com água ultrapura estéril gelada e novamente centrifugadas a 14000 x g, por cinco minutos, a 4°C. Este procedimento de lavagem foi repetido mais duas vezes, uma delas com água e uma última com glicerol 15%

estéril gelado. Foram feitas alíquotas de 150 a 200 µL de células, as quais foram mantidas a -20°C.

3.5.2 Transformação por eletroporação

Alíquotas de células eletrocompetentes foram misturadas com 1 µL de plasmídeos intactos ou reações de ligação. Em seguida, estas células foram transferidas para cubetas de eletroporação e submetidas a um pulso elétrico (4 KΩ, 330 µF). Após recuperação em meio SOC por uma hora, as células foram plaqueadas em meio LA contendo os devidos antibióticos.

3.6 CONJUGAÇÃO BACTERIANA

Estirpes de *E. coli* S17.1 contendo os plasmídeos a serem conjugados e estirpes de *H. seropedicae* (SmR1, Fnr⁻, *ntrC*⁻, *ntrY* e *narL*⁻) foram incubadas durante cerca de 16 horas, sob agitação, a uma temperatura de 37 e 30°C, respectivamente. Em seguida, as células foram misturadas em uma proporção *E. coli*:*H. seropedicae* de 1:20 (50 µL de *E. coli* + 1 mL de *H. seropedicae*), centrifugadas por 15 segundos a 14000 x g. O excesso de meio foi retirado, e o sedimento foi ressuspensão e plaqueado em meio sólido LA/NFb-malato 1:3, sem antibióticos. Após 24 horas de crescimento, a massa de células foi plaqueada em meio sólido NFb-malato contendo os devidos antibióticos e novamente incubada a 30°C por 48 horas.

3.7 TRANSCRIPTOMA POR RNA-seq

3.7.1 Condição de cultivo e extração de RNA

Pré-inóculos de *H. seropedicae* SmR1 crescendo em nitrato de potássio 10 mM com D.O.₆₀₀ próxima a 1,0 (Espectrofotômetro Pharmacia) foram re-inoculados a DO₆₀₀ inicial correspondente a 0,2 em meio contendo NFb-malato e nitrato de potássio 10 mM a 30°C e agitação de 120 rpm. Quando as culturas atingiram DO₆₀₀ de aproximadamente 0,7 (cerca de seis horas de cultivo), as células foram coletadas

e o RNA total foi extraído com o kit RiboPure™-Bacteria (Ambion) segundo orientações do fabricante.

O RNA extraído foi precipitado com acetato de sódio 10%, glicogênio 2% e três volumes de etanol absoluto. O sedimento resultante foi lavado com etanol 70% gelado e ressuspendido em 15 µL de água ultra pura livre de RNase.

3.7.2 Construção da biblioteca de cDNA e sequenciamento

O RNA total extraído conforme o item 3.7.1 foi submetido a uma etapa de eliminação de RNA ribossomal (rRNA), que foi realizada com o kit MICROBExpress™ (Applied Biosystems) segundo instruções do fabricante. Em seguida, 500 ng do RNA foi utilizado para construção da biblioteca de cDNA, utilizando o kit SOLiD Whole transcriptome Analysis, conforme as orientações do fabricante. Depois disso, as bibliotecas foram sequenciadas na plataforma SOLiD 4 (Applied Biosystems). A partir do sequenciamento são obtidas leituras (ou *reads*) com tamanho de 50 pares de base (pb).

3.7.3 Mapeamento e análise dos dados

Os *reads* obtidos através do sequenciamento foram mapeados utilizando o genoma de *H. seropedicae* como referência com o auxílio do programa CLC Genomics Workbench 4.8. Como parâmetros para o mapeamento, foram considerados *reads* únicos, ou seja, que mapearam em apenas um local do genoma de *H. seropedicae*, e que apresentaram erro em até dois pares de base (2 *mismatches*). Além disso, os valores de fração de comprimento mínimo e de fração de similaridade mínima utilizados foram de 0,9 e 0,8 respectivamente. Esses valores significam que pelo menos 90% das bases dos *reads* devem alinhar com 80% de similaridade contra o genoma de *H. seropedicae*.

As análises foram realizadas nos softwares CLC Genomics Workbench 4.8, Microsoft Excel e Artemis. Foram considerados apenas os *reads* que mapearam na direção 5'-3' do gene, ou seja, na direção em que o gene é transcrito. Além disso, foram analisados somente os *reads* que foram mapeados dentro da provável região codificadora do gene. Os *reads* que mapearam contra tRNAs e rRNAs foram excluídos.

Foram construídas quatro bibliotecas, as quais apresentaram tamanhos (número total de *reads*) diferentes. Com isso, para normalização do tamanho delas, o número de *reads* obtido para cada gene (C) foi convertido em RPKM (*reads* por Kilobase do gene por milhão de *reads* mapeados) (MORTAZAVI *et al.*, 2008), considerando o tamanho da biblioteca em *reads* (N) e o tamanho do gene em pares de base (L), utilizando a equação 1.

$$\frac{C \times 10^9}{L \times N}$$

Equação 1

3.8 ANÁLISES DE SEQUÊNCIA *in silico*

As regiões promotoras dos operons *narXL*, *narK₁U* e *nasFED* foram analisadas manualmente e através do programa virtual Footprint (MUNCH *et al.*, 2005), à procura de sítios consenso para as proteínas e sítios de ligação de fatores sigma listados abaixo:

- Fnr (*E. coli*): TTGAT N₄ ATCAA (SPIRO; GUEST, 1990)
- NtrC (*Salmonella* Typhimurium): GCAC N₅ TGGTGCA (FERRO-LUZZI AMES; NIKAIDO, 1985)
- NarL (*E. coli*): TACYYMT (onde Y = T ou C; M = A ou C) (DONG *et al.*, 1992; LI; STEWART, 1992; TYSON *et al.*, 1993; DARWIN *et al.*, 1996)
- σ^{70} (*E. coli*): TTGACA N₁₅₋₁₇ TATAAT (HAWLEY; MCCLURE, 1983)
- σ^{54} (Vários organismos): YTGGCACG N₄ TTGCW (onde Y = T ou C; W = A ou T) (BARRIOS *et al.*, 1999).

A região 5' não codificadora do gene *nasF* foi analisada quanto à presença de estruturas em grampo, as quais podem representar prováveis estruturas de anti-terminação ou terminadoras de transcrição. Elas foram identificadas através do programa RNA-fold (GRUBER *et al.*, 2008), considerando RNAs estáveis a uma temperatura de 90°C.

Os inícios de transcrição dos genes *narK₁* e *nasF* foram previstos utilizando os dados referentes ao transcriptoma, através de análise de distribuição e quantidade de *reads* presentes na região à montante do gene em estudo utilizando o programa Artemis (FIGURA 6).

Os inícios de transcrição foram previstos através de análise dos *reads* localizados à montante do gene em estudo utilizando o programa Artemis. Na figura, a sequência de DNA correspondente à região à montante de *narK*₁ e os primeiros nucleotídeos deste gene são apresentados como exemplo. A região realçada em rosa corresponde à região codificadora de *narK*₁, enquanto que os nucleotídeos anteriores a esta região, correspondem à região de RNA que é transcrita, mas não é traduzida. O provável início de transcrição está indicado pela seta vermelha, enquanto que o início de tradução está indicado pela seta verde.

3.9 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DE *nasFED* POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para amplificar a região regulatória do operon *nasFED* foi utilizado como molde culturas de *H. seropedicae* SmR1 diluídas 10x e os *primers* descritos abaixo:

(5') CTTGGGCGTATCGTCGGCTT (3')

(5') GCCTTGTTGTGAGCCTTGAAT (3')

O sistema de reação foi composto por 0,2 µM de cada *primer*, 0,3 mM de dNTP, tampão de reação com KCl (*nasF*), 1,5 U de *Taq* DNA polimerase, 1,5 mM de cloreto de magnésio (Fermentas) e água ultra pura para completar o volume final para 50 µL.

Os parâmetros utilizados para amplificar as regiões promotoras foram: um ciclo de quatro minutos a 94°C; 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a

55°C (temperatura de anelamento) e 1 e 30 segundos a 72°C; e um último ciclo de três minutos a 72°C.

Os produtos de PCR foram clonados no vetor pTZ57R/T.

3.10 ENSAIO DE ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE

A estirpe selvagem de *H. seropedicae* e as estirpes mutantes (*Fnr*⁻, *ntrC*⁻, *ntrY* ou *narL*⁻) foram conjugadas com plasmídeos contendo as regiões promotoras a serem avaliadas (pPW-*narXL* P/B; pMP-*narK₁U* ou pMP-*nasFED*). Pré-inóculos destas estirpes transconjugantes crescidas em NFb-malato e cloreto de amônio 20 mM com DO₆₀₀ próxima a 1,0 (Espectrofotômetro Pharmacia) foram centrifugadas a 14000 x g por quatro minutos. O sobrenadante foi retirado e foi adicionado meio de cultura para igualar a DO₆₀₀ a 1,0. Em seguida, foi inoculado 1% (v/v) (volume de bactéria/volume de meio) desta mistura em meio malato e em diferentes fontes de nitrogênio: cloreto de amônio 20 mM (alta concentração de nitrogênio), glutamato 5 mM (baixa concentração de nitrogênio), nitrato de potássio 10 mM e nitrato de potássio 10 mM adicionado de cloreto de amônio 1 mM ou glutamato 1 mM.

Além de variar a fonte de nitrogênio, em alguns ensaios a condição de oxigenação das culturas também foi variada, principalmente pela proporção de meio de cultura:capacidade do frasco. Na condição aerobiose foi utilizada proporção de volume de meio de cultura:volume do frasco de aproximadamente 1:10. A condição microaerobiose foi obtida de duas formas. Em uma delas (denominada condição microaerobiose ((5% de oxigênio inicial))) foi utilizada proporção cultura:capacidade do frasco de 1:10. Além disso, foi realizada troca de oxigênio da fase gasosa por nitrogênio ou argônio durante 40 minutos. Após este tempo, provavelmente todo o oxigênio contido dentro do frasco foi substituído por nitrogênio ou argônio. Em seguida, foi injetado ar contendo 5% de oxigênio. Na outra condição de microaerobiose (denominada condição microaerobiose (1:2)), a proporção de volume de meio:volume do frasco foi de 1:2. As culturas foram incubadas por 24 horas para o estudo dos perfis de expressão ao longo do tempo e por seis horas nos ensaios de ponto final.

O nível de indução das regiões promotoras analisadas foi verificado através de ensaios de atividade de β -galactosidade (MILLER, 1992). Foram realizados no mínimo três experimentos independentes, em triplicata biológica.

Nos perfis de expressão ao longo do tempo, o nível de indução das regiões promotoras foi expresso em Unidades Miller. Já nos ensaios de ponto final (seis horas), o nível de indução foi dado em atividade específica, expressa em nmol de o-nitrofenol produzido por minuto e por miligrama de proteína no ensaio.

3.11 DOSAGEM DE PROTEÍNA

As culturas foram lisadas com NaOH 0,1 M por pelo menos três horas, a temperatura ambiente. A concentração de proteínas foi determinada segundo (BRADFORD, 1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3.12 MUTAGÊNESE DOS GENES *nasA* E *narG* DE *H. seropedicae*

A estratégia de mutagênese utilizada está esquematizada na figura 7. Fragmentos entre 500 e 600 pares de base localizados à montante e à jusante dos genes *narG* e *nasA* foram amplificados utilizando os *primers* descritos abaixo. As reações de PCR foram realizadas como descrito no item 3.9, mas utilizando temperatura de anelamento de 50°C e tampão sulfato de amônio ao invés de cloreto de potássio.

Primers para a região de *nasA*:

NASA UP FOR (*Bam*HI)

(5') TCAAGGATCCCAGCAGCAT (3')

NASA UP REV (*Xba*I)

(5') AGCGGAGTCTAGAAAAGATTC (3')

NASA DOWN FOR (*Xba*I)

(5') GAGGTCAGACTCTAGAACGC (3')

NASA DOWN REV (*Sal*I)

(5') CAACATTGTCGACCGAATCC (3')

Primers para a região de *narG* :

NARG UP FOR (*Bam*HI)

(5') GCTCTTCCTGGATCCCTTC (3')

NARG UP REV (*Xba*I)

(5') ATGAATTTCTAGAGGTCCAGA (3')

NARG DOWN FOR (*Xba*I)

(5') CGTCCTGCTCTAGATGAACA (3')

NARG DOWN REV (*Sa*II)

(5') GTGCTGTCGACTTCCTTCTG (3')

Os produtos de PCR gerados foram digeridos com a enzima de restrição *Xba*I. Em seguida, o fragmento *narG* UP foi ligado ao *narG* DOWN e *nasA* UP foi ligado ao *nasA* DOWN. Uma nova PCR utilizando os *primers* NARG UP FOR/NARG DOWN REV ou NASA UP FOR/NASA DOWN REV permitiu a seleção e amplificação dos fragmentos ligados (*narG* UP-DOWN ou *nasA* UP-DOWN, respectivamente). Em seguida, os fragmentos ligados foram digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Sa*II e ligados no vetor pSUP202, gerando os plasmídeos pSUP-*narG* e pSUP-*nasA*. O vetor pMH1701 foi digerido com a enzima de restrição *Bam*HI, liberando o fragmento de DNA *sacB-Km*. Este fragmento foi então ligado nos plasmídeos pSUP-*narG* e pSUP-*nasA* digeridos com *Bam*HI, originando os novos plasmídeos pSUP-*narG-sacB* e pSUP-*nasA-sacB*, respectivamente.

Os plasmídeos pSUP-*narG-sacB* e pSUP-*nasA-sacB* foram conjugados em *H. seropedicae*. A seleção dos transconjugantes foi feita através do antibiótico canamicina, resistência conferida pelo fragmento *sacB-Km*. Neste momento, esperava-se que tivesse ocorrido o primeiro evento de recombinação, onde o plasmídeo integra-se ao genoma através de recombinação homóloga entre o gene selvagem e o fragmento UP ou DOWN contido no plasmídeo.

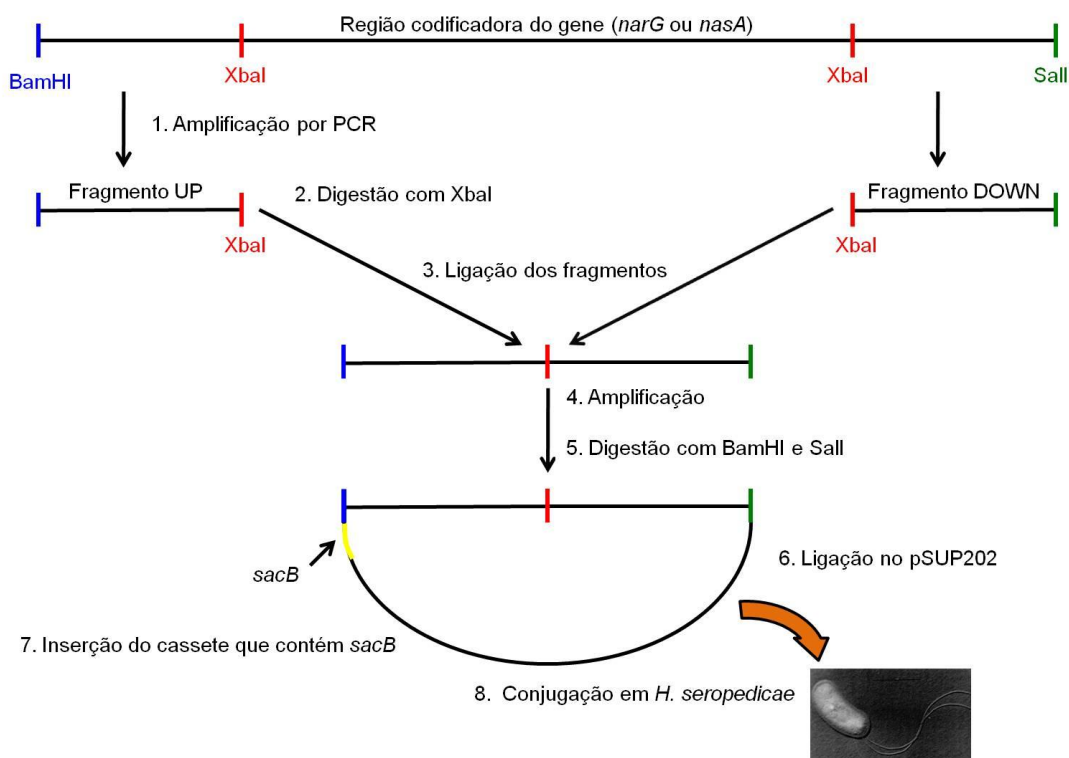


FIGURA 7 – ESTRATÉGIA UTILIZADA PARA OBTENÇÃO DOS MUTANTES *narG*⁻ E *nasA*⁻ DE *H. seropedicae*

Em seguida, as estirpes de *H. seropedicae* contendo o plasmídeo foram inoculadas em meio líquido sem antibiótico para selecionar estirpes que sofreram o segundo evento de recombinação. Este se caracteriza pela saída do plasmídeo do genoma, carregando parte do gene a ser deletado. A região deletada foi substituída pelo fragmento *narG* UP-DOWN ou *nasA* UP-DOWN, que foi denominada de “cópia deletada”. A seleção das colônias que sofreram o segundo evento de recombinação foi feita através de plaqueamento em meio NFb-malato sólido contendo sacarose 10%. O gene *sacB* codifica uma enzima que converte sacarose em frutose, a qual é acumulada no espaço periplasmático na forma de polímeros de frutose, levando a lise das células (STEINMETZ *et al.*, 1983). Consequentemente, somente haveria seleção das colônias que não continham o plasmídeo pSUP-*narG-sacB* ou pSUP-*nasA-sacB*, ou seja, que sofreram o segundo evento de recombinação.

A confirmação dos mutantes foi realizada através de duas PCRs. Em uma delas a presença da “cópia deletada” do gene foi confirmada utilizando os *primers* NARG UP FOR e NARG DOWN REV para o mutante *narG*⁻ ou *primers* NASA UP

FOR e NASA DOWN REV para o mutante *nasA*⁻. A segunda PCR foi realizada para confirmar que as estirpes mutantes não continham uma cópia intacta dos genes a serem deletados. Para isso, foi utilizado um *primer* que anela dentro da região que foi deletada. Dessa maneira, deveria haver amplificação apenas na estirpe selvagem e não nas estirpes mutantes construídas. A seguir, estão listados os primers utilizados para confirmar as deleções dos genes *narG* e *nasA*:

Primers para a região de narG:

NARG UP FOR (*Bam*HI)

(5') GCTCTTCCTGGATCCCTTC (3')

NarG REV (*Xba*I) (Miguel, 2011)

(5') gaattcATTGACCACCGCC (3')

Primers para a região de nasA:

NasA REV (Miguel, 2011)

(5') agatctCCTGGATGCCGAT (3')

NasA reverse (RT) (Guimarães, 2011)

(5') CGTGAATTGGTGTGCGATGTTG (3')

3.13 CURVAS DE CRESCIMENTO DE ESTIRPE SELVAGEM E ESTIRPES MUTANTES

Pré-inóculos em meio NFb contendo glutamato 10 mM, de estirpe selvagem e estirpes mutantes com DO₆₀₀ próxima de 1,0 (Espectrofotômetro Pharmacia) foram centrifugadas a 5000 x g por quatro minutos. O sobrenadante foi retirado, e foi adicionado volume de cultura para igualar a DO₆₀₀ a 2,0. Foram inoculados 300 µL desta mistura, em 6 mL de meio NFb, na condição aerobiose ou 1,25 mL em 25 mL de meio na condição microaerobiose. Desse modo, a DO₆₀₀ foi igualada a 0,1 (Espectrofotômetro Pharmacia), que equivale a DO₆₀₀ de 0,04 no leitor de microplacas Biotek (ELx800). A curva foi realizada em duas fontes de nitrogênio: cloreto de amônio 20 mM ou nitrato de potássio 10 mM.

As culturas foram incubadas a 30°C a 120 rpm. Na condição aerobiose, foram retiradas alíquotas para leitura de DO₆₀₀ no leitor de microplacas Biotek nos

tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 h. Além disso, foram retiradas alíquotas nos tempos de 4, 8, 10 e 24 h para dosagem de nitrito.

Na condição microaerobiose foram retiradas alíquotas para leitura de DO_{600} no leitor de microplacas Berthold (TriStar LB 941) e para dosagem de proteína nos tempos de 0 a 14, 16, 24, 30 e 36 horas. Alíquotas para dosagem de nitrito foram retiradas a cada duas horas, dentro dos tempos indicados. Além disso, nos tempos de 0, 4, 8, 12, 16, 24, 30 e 36 horas foram retiradas alíquotas para contagem de células viáveis (item 3.15).

3.14 DOSAGEM DE NITRITO

O nitrito no sobrenadante das culturas foi dosado conforme XU e colaboradores (2000). Em placa de Elisa foi adicionado 20 μ L da amostra ou padrão. Em seguida, foi adicionado 100 μ L de sulfanilamida 1% em HCl 3M, seguido de adição de 100 μ L de dicloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamida 0,02%. Após cerca de 10 minutos, a absorbância foi avaliada em leitor de microplacas (Biotek) no comprimento de onda de 540 nm. Nitrito de sódio foi utilizado como padrão, nas concentrações entre 0,2 e 1,0 mg N/L. A concentração de nitrito no meio foi convertida em mM.

3.15 CONTAGEM DE BACTÉRIAS POR PLAQUEAMENTO

O número de bactérias viáveis em meio líquido foi estimado através de diluição seriada das culturas em salina estéril (NaCl 0,9%), seguido de plaqueamento em meio NFb-malato. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia por 1 mL de cultura (UFC/mL).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PERFIL GLOBAL DE EXPRESSÃO DE *H. seropedicae* NA PRESENÇA DE NITRATO ATRAVÉS DE TRANSCRIPTOMA POR RNA-seq

Microorganismos estão sujeitos a várias alterações ambientais, tais como disponibilidade de diferentes fontes de nitrogênio ou mudança na taxa de oxigênio disponível. Desse modo, eles devem responder de forma apropriada a essas modificações através da regulação da expressão gênica, seja transcricional, traducional ou pós-traducionalmente. Desde 2009 (PASSALACQUA *et al.*, 2009), o transcriptoma utilizando novas plataformas de sequenciamento (RNA-seq) tem sido utilizado para analisar perfis globais de expressão em bactérias, em resposta a fatores ambientais. Alguns exemplos são a resposta à anaerobiose em *Neisseria gonorrhoeae* (ISABELLA; CLARK, 2011) e a resposta à diferentes condições de fixação de nitrogênio em *Azotobacter vinelandii* (HAMILTON *et al.*, 2011).

Com isso, no presente trabalho foi avaliada a resposta de *H. seropedicae* à variação da fonte de nitrogênio ao nível transcricional: nitrato, fonte mais comum no solo, em relação à amônio, a fonte de nitrogênio mais facilmente assimilada. Para isso, *H. seropedicae* foi cultivado na presença de nitrato como fonte única de nitrogênio e RNA total foi extraído para construção de bibliotecas de cDNA, as quais foram sequenciadas em plataforma SOLiD. Essas bibliotecas foram comparadas com bibliotecas obtidas a partir de *H. seropedicae* crescendo em amônio como fonte única de nitrogênio (TADRA-SFEIR, 2011).

4.1.1 Extração de RNA, construção da biblioteca de cDNA e análise dos dados

O RNA total foi extraído de duas culturas independentes de *H. seropedicae* crescido em nitrato de potássio 10 mM, a 30°C e 120 rpm até DO₆₀₀ de 0,7. Foram obtidos aproximadamente 600 ng/μL de RNA para cada uma das duas amostras (FIGURA 8A). Após precipitação do RNA, 7 μg de RNA de cada amostra foi submetido a duas etapas de depleção de rRNA. Na primeira depleção, restaram por volta de 1,5 μg de RNA para cada amostra. Como ainda era possível visualizar bandas correspondentes ao rRNA no gel (FIGURA 8B), uma segunda depleção de rRNA foi realizada. Para cada replicata biológica, foram recuperadas por volta de

700 ng de RNA depletado. As demais etapas foram realizadas conforme descrito na seção 3.7 de Material e Métodos.

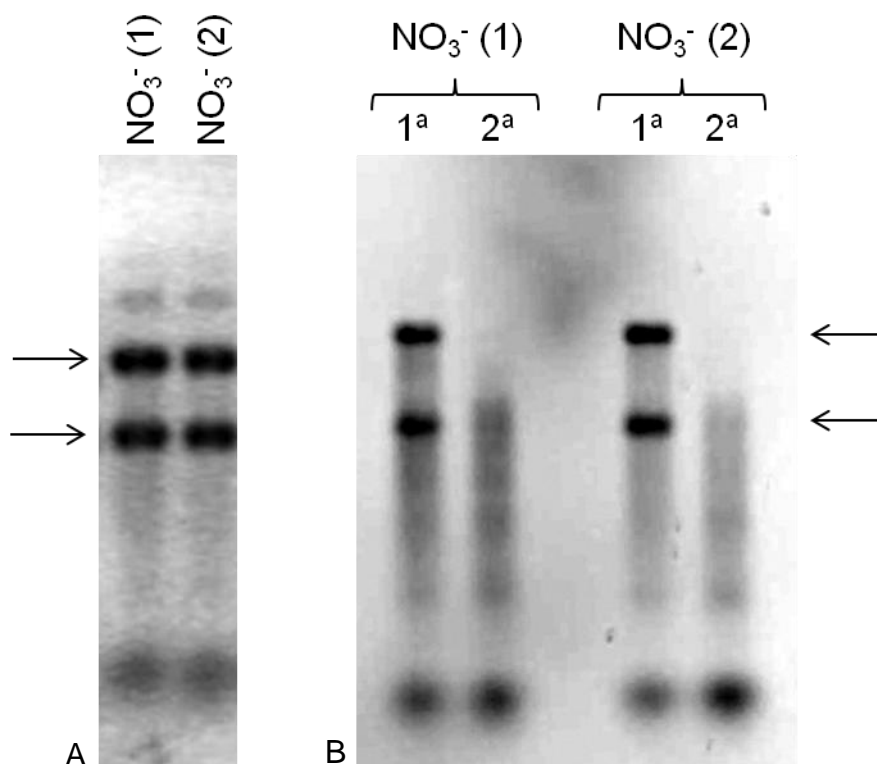


FIGURA 8 – RNA TOTAL DE *H. seropedicae* SmR1 ANTES E APÓS DEPLEÇÃO DE rRNA

Perfil eletroforético em gel de agarose 1% em TBE 1x. A) RNA total extraído de *H. seropedicae* SmR1 crescido em nitrato até D.O.₆₀₀ 0,7; B) RNA após primeira e segunda depleção de rRNA, conforme indicado. NO_3^- (1) e NO_3^- (2) referem-se à duplicata biológica. O rRNA está indicado pelas setas.

Foram construídas e sequenciadas quatro bibliotecas de cDNA: duas replicatas biológicas (Nitrato 1 e Nitrato 2) e duas replicatas técnicas (Nitrato A e Nitrato B) (Tabela 4), atingindo um total de aproximadamente 160 milhões de *reads*. Estes *reads* foram mapeados contra o genoma de *H. seropedicae* e a quantidade de *reads* obtida para cada gene foi expressa em RPKM. Conforme os parâmetros utilizados no mapeamento, somente foram aceitos *reads* que alinharam pelo menos 43 pb (de 50 pb) no genoma de *H. seropedicae* (Seção 3.7.3). Para as análises seguintes, foram considerados apenas *reads* únicos, mapeados dentro da região codificadora de cada gene e na direção 5'-3'. Além disso, foram excluídos os *reads* que correspondem a RNA transportador (tRNA). Somando as quatro bibliotecas

Nitrato, foram obtidos aproximadamente 10 milhões de *reads* únicos, que corresponde a uma cobertura de 91,1 vezes o tamanho do genoma de *H. seropedicae* (o qual apresenta cerca de 5,5 milhões de pares de base) (PEDROSA *et al.*, 2011).

TABELA 4 – BIBLIOTECAS DE cDNA CONSTRUÍDAS DE *H. seropedicae* CRESCIDO EM NITRATO E AMÔNIO

Biblioteca	Número de <i>reads</i> únicos	Total de <i>reads</i> da biblioteca	Porcentagem de <i>reads</i> únicos	
Nitrato 1A	3.327.416	44.171.342	7,5%	Este trabalho
Nitrato 1B	1.943.547	36.607.151	5,3%	Este trabalho
Nitrato 2A	2.189.974	48.595.533	4,5%	Este trabalho
Nitrato 2B	2.711.726	28.649.324	9,5%	Este trabalho
Amônio 1	1.241.545	35.440.472	3,5%	(TADRA-SFEIR, 2011)
Amônio 2	1.113.660	31.217.824	3,6%	(TADRA-SFEIR, 2011)

Para avaliar a reprodutibilidade dos dados, os valores de RPKM das replicatas técnicas foram comparados entre si (Nitrato 1A x Nitrato 1B ou Nitrato 2A x Nitrato 2B) (FIGURAS 9A e 9B). O valor do coeficiente de determinação (R^2) acima de 0,99 obtido para estas amostras mostra que elas são muito semelhantes entre si. Com isso, elas foram unidas, constituindo as replicatas biológicas Nitrato 1 e Nitrato 2. Comparando estas duas últimas bibliotecas uma contra outra, percebe-se que elas apresentam um grau de semelhança satisfatório ($R^2 = 0,864$) (FIGURA 9C).

O efeito do nitrato sobre a expressão gênica foi avaliado através da comparação com a biblioteca construída nas mesmas condições descritas anteriormente, exceto pela fonte de nitrogênio, amônio ao invés de nitrato (Biblioteca Amônio) (TADRA-SFEIR, 2011) (Tabela 4). Além disso, a biblioteca Amônio foi submetida a apenas um procedimento de eliminação de rRNA, o que explica as menores porcentagens de *reads* únicos obtidas para esta biblioteca em relação à biblioteca Nitrato, a qual foi depletada duas vezes de rRNA. As bibliotecas Amônio foram construídas em replicata biológica (Amônio 1 e Amônio 2) e analisadas da mesma forma que as bibliotecas Nitrato 1 e 2.

Na comparação entre os valores de RPKM da Biblioteca Amônio e da Biblioteca Nitrato, verificou-se que as duas bibliotecas são bem diferentes entre si

($R^2 = 0,159$) (FIGURA 9D). Este resultado, como esperado, mostra que alterando a fonte de nitrogênio, há grandes alterações no perfil de expressão global de uma bactéria.

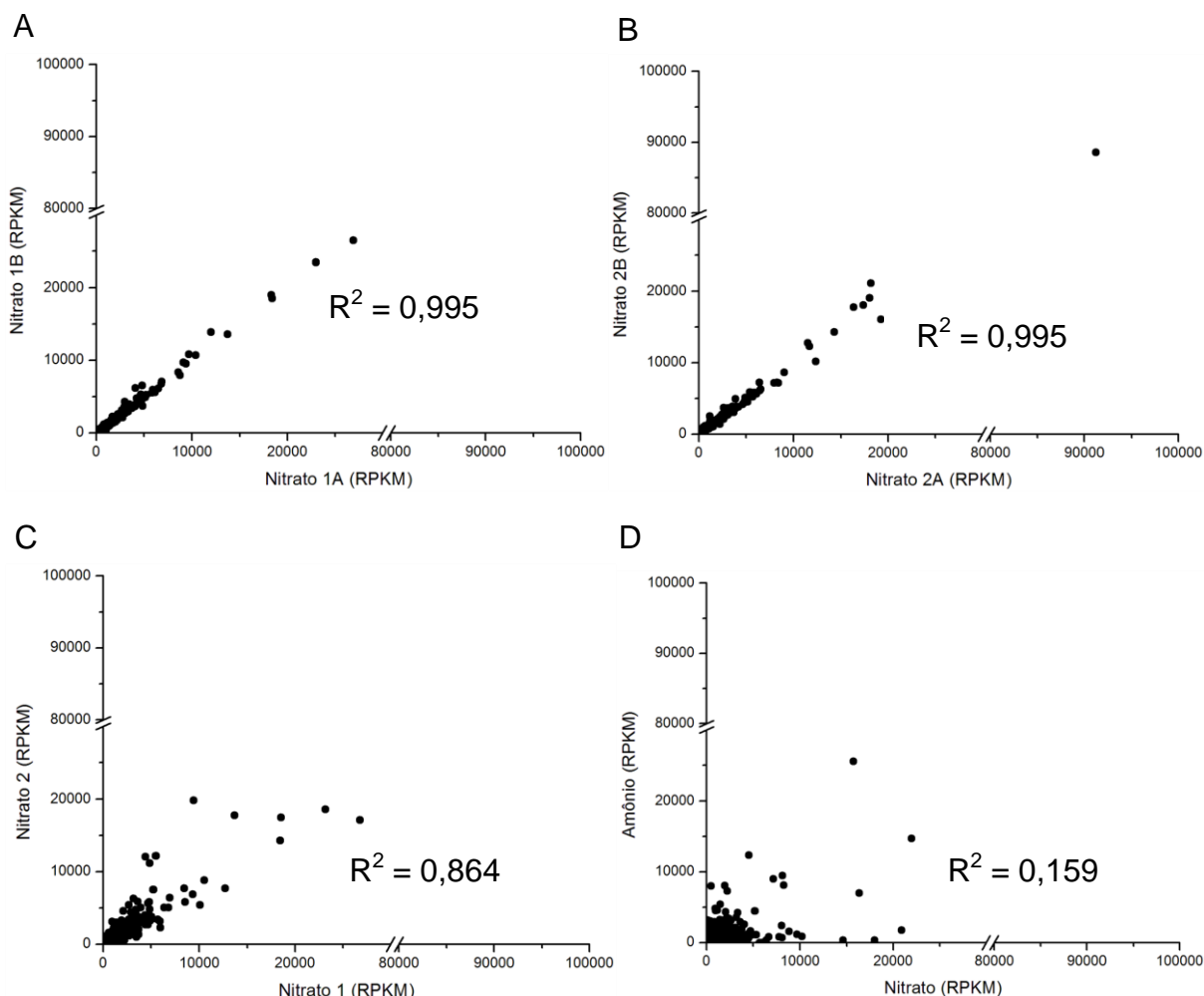


FIGURA 9 – COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES BIBLIOTECAS DE cDNA CONSTRUÍDAS

Os valores de RPKM de cada gene e de diferentes bibliotecas de cDNA foram comparados entre si. O valor de coeficiente de determinação (R^2) foi obtido utilizando o programa Microsoft Excel. A) Comparação entre a replicata técnica Nitro 1A e Nitro 1B; B) comparação entre a replicata técnica Nitro 2A e Nitro 2B; C) comparação entre as replicatas biológicas Nitro 1 e Nitro 2; D) comparação entre Biblioteca Amônio e Biblioteca Nitro.

A variação do nível de transcrição de um dado gene em nitrato foi calculado através da divisão do valor de RPKM da biblioteca Nitro pelo RPKM da biblioteca Amônio. Foram considerados como candidatos a expressão diferencial, os genes que tiveram quantidade de *reads* suficiente para cobrir o tamanho da sequência do gene em cinco vezes (cobertura de cinco vezes) em pelo menos uma das bibliotecas

e p -valor menor que 0,05, o qual foi calculado através do programa CLC Genomics Workbench 4.8. Genes foram considerados como diferencialmente transcritos em nitrato se apresentassem diferença de pelo menos duas vezes na razão do valor de RPKM da biblioteca Nitrato pelo valor de RPKM da Biblioteca Amônio.

4.1.2 Efeito do nitrato sobre o metabolismo global de *H. seropedicae*

Dos 4804 genes de *H. seropedicae*, foram encontrados 1619 genes diferencialmente transcritos em nitrato, sendo 377 genes induzidos (7,8%) e 1242 reprimidos (25,8%) (ANEXOS 1 e 2). A maioria destes genes apresenta nível de transcrição diferencial em nitrato entre dois a três, tanto os induzidos como os reprimidos (FIGURA 10). Entretanto, é possível encontrar genes cujo nível de indução/repressão ultrapassa 100 vezes.

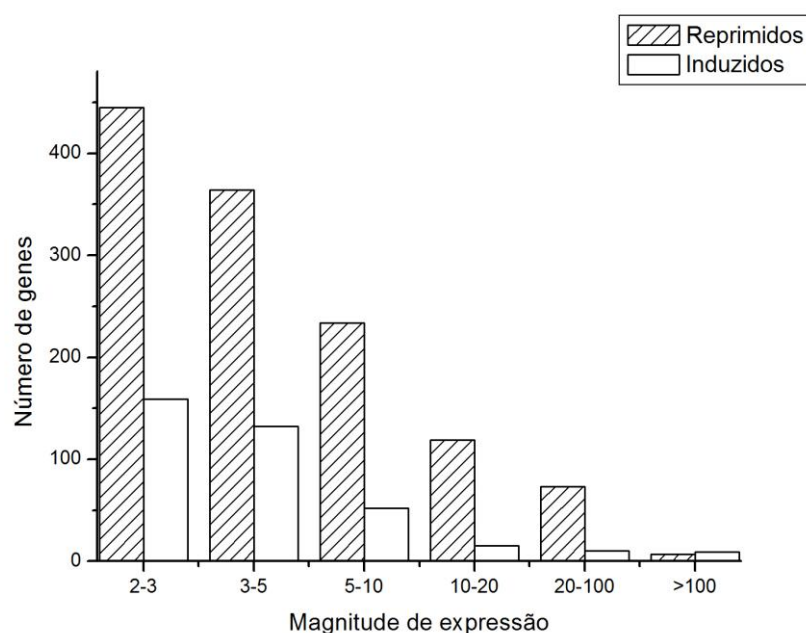


FIGURA 10 – DISTRIBUIÇÃO DE GENES COM TRANSCRIÇÃO DIFERENCIAL EM NITRATO EM RELAÇÃO À MAGNITUDE DE EXPRESSÃO

Genes diferencialmente transcritos em nitrato foram agrupados em relação à magnitude de expressão diferencial: 2-3 corresponde a genes de duas a três vezes regulados (induzidos ou reprimidos), 3-5, 5-10, 10-20 e 20-100 correspondem a genes de três a cinco vezes, de cinco a dez vezes, de dez a 20 vezes e de 20 a 100 vezes regulados, respectivamente; >100 corresponde a genes regulados em mais de 100 vezes.

A figura 11 mostra a distribuição dos genes regulados (induzidos e reprimidos) em relação à categoria funcional segundo classificação do COG (Clusters of Orthologous Groups of Proteins). A maioria dos genes regulados tem Função desconhecida (S), o que mostra que muitos genes de *H. seropedicae* que

respondem a nitrato ainda não são bem conhecidos. Genes envolvidos com Mecanismos de transdução de sinal (T), Controle do ciclo celular, divisão celular e partição do cromossomo (D), e Motilidade celular (N) também estão entre as categorias mais reguladas.

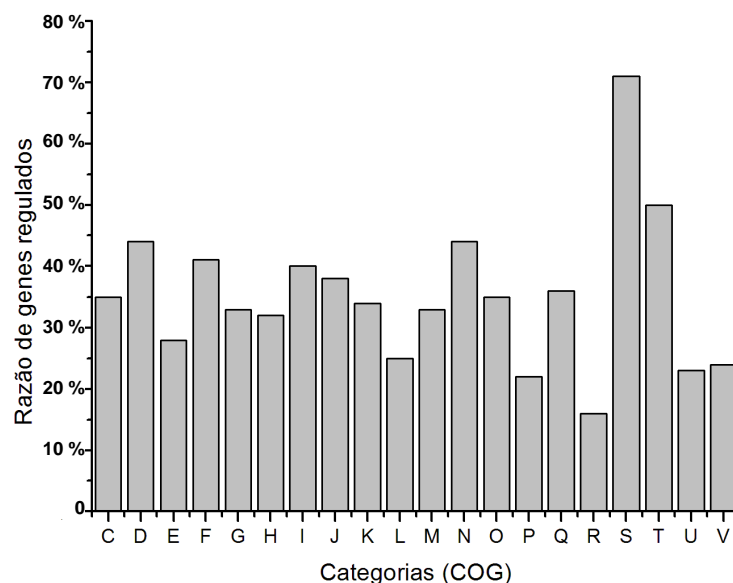


FIGURA 11 – DISTRIBUIÇÃO DE GENES COM TRANSCRIÇÃO DIFERENCIAL EM NITRATO EM RELAÇÃO À CATEGORIA (COG)

Os valores no eixo Y correspondem à porcentagem de genes regulados em cada categoria, a qual foi obtida pela razão percentual de genes regulados (induzidos ou reprimidos) em uma dada categoria pelo total de genes de cada categoria funcional baseada no COG. C) Produção e conversão de energia; D) Controle do ciclo celular, divisão celular e partição do cromossomo; E) Transporte e metabolismo de aminoácidos; F) Transporte e metabolismo de nucleotídeos; G) Transporte e metabolismo de carboidratos; H) Transporte e metabolismo de coenzimas; I) Transporte e metabolismo de lipídios; J) Tradução, estrutura e biogênese ribossomal; K) Transcrição; L) Replicação, recombinação e reparo de DNA; M) Parede celular; N) Motilidade celular; O) Modificação pós-traducional, enovelamento de proteínas, chaperonas; P) Transporte e metabolismo de íons inorgânicos; Q) Biossíntese, transporte e catabolismo de metabólitos secundários; R) Função geral predita apenas; S) Função desconhecida; T) Mecanismos de transdução de sinal; U) Tráfego intracelular, secreção e transporte de vesículas e V) Mecanismos de defesa.

4.1.3 Efeito do nitrato sobre a transcrição de genes envolvidos com o metabolismo do nitrato em *H. seropedicae*

Dentre os genes com maior nível de transcrição diferencial em nitrato destacam-se os genes que constituem o provável operon *narK₁UGHJlmoaA* (Tabela 5). É possível dizer que estes genes não são expressos em amônio, já que pouquíssimos *reads* correspondentes a estes genes foram detectados nesta

condição. Com isso, o valor de RPKM deles é muito baixo (entre 0,2 e 6,0). Em nitrato, por outro lado, os valores de RPKM destes genes são muito altos comparando com os demais genes do genoma de *H. seropedicae*.

TABELA 5 – NÍVEL DE TRANSCRIÇÃO DIFERENCIAL EM NITRATO DOS GENES RELACIONADOS COM A NITRATO REDUTASE RESPIRATÓRIA

Gene	Nível de transcrição diferencial em nitrato	<i>p</i> -valor
<i>narK₁</i>	2.660,0	0,00000
<i>narU</i>	10.623,0	0,00000
<i>narG</i>	2.897,5	0,00000
<i>narH</i>	1.152,6	0,00000
<i>narJ</i>	719,3	0,00000
<i>narI</i>	886,2	0,00000
<i>moaA</i>	391,3	0,00000
<i>narX</i>	6,0	0,00000
<i>narL</i>	13,5	0,00002

O *p*-valor para cada gene foi calculado através do software CLC Genomics Workbench 4.8, através do teste de Baggerly e colaboradores (BAGGERLY *et al.*, 2003).

Houve uma diferença de quase duas vezes entre os valores de RPKM de *narK₁* ou *narU* em comparação com *narG* (valores de RPKM de *narK₁*, *narU* e *narG* correspondentes a 2636, 3093 e 5920, respectivamente) (FIGURA 12). Essa diferença sugere a existência de um promotor entre os genes *narU* e *narG*. Dados preliminares de ensaios de β -galactosidase com a fusão transcricional *narG-lacZ* sugerem que há uma região promotora funcional nesta região (MIGUEL, 2011). O gene *narH* apresentou valor de RPKM muito próximo ao de *narG* (valores de RPKM de *narH* e *narG* correspondentes a 5685 e 5920, respectivamente), o que é um indício de que estes genes são co-transcritos. Por outro lado, os genes *narJ*, *narI* e *moaA* apresentaram uma queda progressiva no valor de RPKM em comparação com os genes à montante deles (*narG*, *narH*). Esta observação é consistente com o fato de serem os últimos genes operon, pois é sabido que a RNA polimerase para de forma inespecífica e prematura enquanto transcreve longas sequências de RNA.

À jusante do operon *narK₁UGHJImoaA* estão localizados os genes *narXL*, os quais em *E. coli* e *P. aeruginosa* também estão relacionados com a regulação da nitrato redutase respiratória e de outros genes envolvidos com o metabolismo de

nitrito. Os níveis de transcrição em nitrato destes genes foram entre 6 e 13 vezes mais altos que em amônio, respectivamente (TABELA 5).

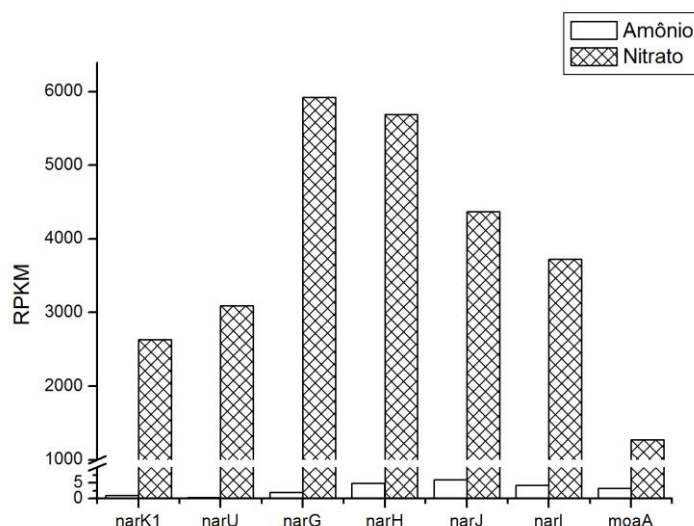


FIGURA 12 – VALORES DE RPKM DOS GENES DO OPERON *narK₁UGHJImoaA*

Além do agrupamento de genes que codificam para a nitrato redutase respiratória, uma segunda região do genoma de *H. seropedicae* contém genes relacionados com a nitrato redutase assimilatória (*Hsero_2899* e *nasA*), nitrito redutase (*nirBD*) e transportador de nitrato/nitrito (*narK*). Além disso, em duas outras regiões do genoma deste microrganismo também se encontram genes relacionados com transporte de nitrato/nitrito e um regulador transcricional (*nasFED* e *nasR*). Todos estes genes, exceto *nasR*, estão induzidos na presença de nitrato (TABELA 6). Entretanto, com exceção de *narK*, estes genes apresentaram *p*-valor acima do corte estabelecido ($p < 0,05$).

Os genes que possivelmente são co-transcritos no provável operon *narKnirBDHsero_2899nasA* apresentam nível de indução da transcrição entre 4,9 e 17 vezes (Tabela 6). Os genes *nasFE* também estão induzidos em resposta a nitrato (4,4 a 2,6 vezes). O nível de transcrição de *nasD*, terceiro gene do operon *nasFED*, está apenas levemente induzido (1,7 vezes), abaixo do valor de corte escolhido (2,0). Finalmente, o gene *nasR*, que codifica para um anti-terminador de transcrição, encontra-se constitutivo.

Como comentado anteriormente, as replicatas biológicas da biblioteca Nitrato são muito próximas ($R^2 = 0,864$) (FIGURA 9C). Apesar disso, o p -valor para a maioria dos genes representados na tabela 6 são maiores que 0,05. Por isso, na tabela 6 também são apresentados os níveis de transcrição diferencial em nitrato, considerando as replicatas biológicas de Amônio e Nitrato de forma separada, nas quatro combinações possíveis: Nitrato 1 x Amônio 1; Nitrato 1 x Amônio 2; Nitrato 2 x Amônio 1 e Nitrato 2 x Amônio 2. Como resultado, observa-se que o p -valor maior que 0,05 encontrado para estes genes é principalmente devido a diferenças entre as duas replicatas biológicas da Biblioteca Nitrato. Em geral os níveis de indução calculados a partir da Biblioteca Nitrato 2 foram maiores.

TABELA 6 – NÍVEL DE TRANSCRIÇÃO DIFERENCIAL EM NITRATO DOS GENES RELACIONADOS COM A NITRATO REDUTASE ASSIMILATÓRIA

Gene	Nível de transcrição diferencial em nitrato ¹	p -valor	N1/A1	N1/A2	N2/A1	N2/A2
<i>narK</i>	11,3	0,025	5,4	9,4	12,3	22,2
<i>nirB</i>	16,0	0,064	8,1	7,9	24,1	24,1
<i>nirD</i>	17,1	0,081	- ²	4,0	- ²	13,1
<i>Hsero_2899</i>	5,7	0,091	2,0	6,0	5,6	17,0
<i>nasA</i>	4,9	0,076	2,4	3,1	6,3	8,2
<i>nasF</i>	4,4	0,249	2,0	1,1	10,0	5,7
<i>nasE</i>	2,6	0,282	-1,3	2,7	2,6	9,2
<i>nasD</i>	1,7	0,289	1,3	-1,1	2,9	2,0
<i>nasR</i>	-1,1	0,787	-1,2	-1,4	1,1	1,0

O p -valor para cada gene foi calculado através do software CLC Genomics Workbench 4.8, através do teste de Baggerly e colaboradores (BAGGERLY *et al.*, 2003). ¹O nível de transcrição diferencial em nitrato representa a razão da média do RPKM das Bibliotecas Nitrato 1 e 2 pela média do RPKM das Bibliotecas Amônio 1 e 2. Os demais níveis de transcrição diferencial em nitrato representam a razão do RPKM de uma dada biblioteca Nitrato, pelo RPKM de uma dada biblioteca Amônio, em quatro combinações diferentes conforme indicado: Nitrato 1 vs. Amônio 1 (N1/A1); Nitrato 1 vs. Amônio 2 (N1/A2); Nitrato 2 vs. Amônio 1 (N2/A1) e Nitrato 2 vs. Amônio 2 (N2/A2). ²Não foi possível calcular o nível de transcrição diferencial porque o número de *reads* da Biblioteca amônio foi igual a zero.

Os resultados encontrados a partir do transcriptoma de *H. seropedicae* crescendo em nitrato mostram que a expressão do operon *narK₁UGHJImoaA*, que contém os genes que codificam para a provável nitrato redutase respiratória, é fortemente induzida. A transcrição destes genes, como será discutido na seção 4.2.2 e visualizado na Figura 12, é fortemente regulada e induzida apenas na presença de

nitrato e em níveis mais baixos de oxigenação das culturas. Esta última condição, durante o cultivo para a construção das bibliotecas do transcriptoma provavelmente foi obtida através de uma DO₆₀₀ das culturas mais alta (0,7) e baixa agitação (120 rpm).

Os níveis de transcrição diferencial em nitrato obtidos para os genes do operon *narK₁UGHJlmoaA* (de 391,3 a 10.623,0) são bem superiores a resultados anteriores obtidos por quantificação por PCR em tempo real. Estas últimas análises mostraram que a transcrição dos genes *narU* e *narG* foi induzida de 150 a 250 vezes em culturas de *H. seropedicae* crescendo em nitrato e DO₆₀₀ de 0,5 e 1,0 (GUIMARÃES, 2011). Entretanto, essas diferenças entre quantificação de expressão de um gene por RNA-seq e PCR em tempo real podem acontecer porque a análise de transcrição diferencial por RNA-seq não apresenta limites máximo ou mínimo de quantificação. Com isso, esta última técnica permite a quantificação de nível de transcrição em uma amplitude maior, em relação ao PCR em tempo real (WANG *et al.*, 2009).

O nível de transcrição diferencial de *narX* observado neste trabalho foi próximo ao obtido anteriormente em DO₆₀₀ de 1,0 (GUIMARÃES, 2011). Esses resultados mostram que os genes relacionados com a nitrato redutase respiratória são importantes para o metabolismo de nitrato de *H. seropedicae* entre DO₆₀₀ de 0,7 a 1,0, provavelmente devido a uma menor oxigenação das culturas nestas condições.

Os genes relacionados com a nitrato redutase assimilatória apresentam-se em geral induzidos por nitrato, mas em um nível bem inferior do que o observado para genes envolvidos com a nitrato redutase respiratória. Entretanto são observadas diferenças no nível de transcrição diferencial dependendo da replicata biológica da biblioteca Nitrato analisada. Os genes dos prováveis operons *narKnirBDHsero_2899nasA* e *nasFED* apresentaram maior nível de indução na biblioteca Nitrato 2 quando comparado com a biblioteca Nitrato 1. Já foi mostrado por PCR em tempo real que os genes *narK*, *nirD*, *nasA* e *nasF* são induzidos de cerca de 40 a 200 vezes em DO₆₀₀ 0,5. Já em DO₆₀₀ 1,0 os níveis de indução destes genes caem para cerca de três e 15 vezes (GUIMARÃES, 2011). Isso mostra que a transcrição destes genes varia muito entre os dois períodos analisados. Com isso, pequenas diferenças nas densidades ópticas das replicatas biológicas utilizadas

para a análise do transcriptoma resultaram em diferenças significativas no nível de indução dos genes relacionados com assimilação de nitrato.

O *p*-valor acima de 0,05 encontrado para o gene *nasR* provavelmente está relacionado ao seu baixo nível de indução. Como o valor de transcrição diferencial em nitrato de *nasR* é próximo de 1,0, pode-se dizer que ele apresenta expressão constitutiva nas condições testadas. Comparando com os dados de PCR em tempo real para este gene, este resultado está mais próximo ao valor obtido para DO₆₀₀ de 0,5 (cerca de 2x) em relação a DO₆₀₀ 1,0 (cerca de 8x) (GUIMARÃES, 2011).

4.1.4 Efeito do nitrato sobre a transcrição de genes não diretamente envolvidos com o metabolismo do nitrato em *H. seropedicae*

Além de afetar genes que estão diretamente envolvidos com o metabolismo de nitrato, o nitrato também induziu a expressão de genes relacionados a outras vias de *H. seropedicae* (TABELA 7). Entre eles, destaca-se o gene *Hsero_2508* que codifica para uma provável óxido nítrico dioxigenase. Além disso, genes que codificam para proteínas relacionadas com estresse universal (*uspA* e *cspD*) e proteínas relacionadas ao metabolismo de polibetahidroxibutirato (PHB) também são induzidos por nitrato. Os genes que codificam para subunidades da enzima glutamato sintase também estão induzidos (*gltBD*). Apesar disso, o gene *glnA* que codifica para a glutamina sintase apresenta expressão constitutiva.

O produto do gene *Hsero_2508* está relacionado com o metabolismo de nitrogênio e está anotado como óxido nítrico dioxigenase. Em *E. coli*, esta enzima converte óxido nítrico a nitrato em aerobiose e a óxido nitroso em anaerobiose (POOLE; HUGHES 2000). A forte indução do gene *Hsero_2508* não era esperada já que *H. seropedicae* não apresenta enzimas que diretamente produzam óxido nítrico. Contudo, estudos recentes têm mostrado que o complexo enzimático NarGHI de *E. coli* e *Salmonella enterica* reduz nitrito a óxido nítrico em baixos níveis de nitrato (VINE; COLE 2011). Em *H. seropedicae*, mais que converter nitrato a nitrito, NarGHI pode ser importante na detoxificação de nitrito, através da conversão de nitrito a óxido nítrico. Desse modo, o óxido nítrico poderia ser removido da célula através do produto do gene *Hsero_2508*. Foi proposto que o produto do gene *Hsero_2508* de *H. seropedicae* pode detoxificar o óxido nítrico que é produzido pela planta durante a interação planta-bactéria (PEDROSA *et al.*, 2011). Além de ter esta função, o

produto do gene *Hsero_2508* também poderia ser importante na detoxificação do óxido nítrico produzido pela própria bactéria através de NarGHI.

TABELA 7 – NÍVEL DE TRANSCRIÇÃO DIFERENCIAL EM NITRATO DE GENES NÃO DIRETAMENTE ENVOLVIDOS COM O METABOLISMO DE NITRATO

Gene	Nível de transcrição diferencial em nitrato	p-valor	Função geral
<i>Hsero_2508</i>	852,9	0,00000	Óxido nítrico dioxigenase
<i>gltB</i>	2,8	0,00000	Glutamato sintase
<i>gltD</i>	3,4	0,00000	Glutamato sintase
<i>cspD</i>	14,4	0,00000	Estresse ambiental
<i>cspD</i>	11,9	0,00000	Estresse ambiental
<i>uspA</i>	4,6	0,00000	Estresse ambiental
<i>phaC</i>	3,1	0,04716	Metabolismo de PHB
<i>phaZ</i>	2,1	0,02168	Metabolismo de PHB
<i>phbA</i>	3,4	0,00000	Metabolismo de PHB
<i>phbA₂</i>	5,5	0,03074	Metabolismo de PHB
<i>phbB</i>	2,0	0,00000	Metabolismo de PHB
<i>phbF</i>	8,5	0,00000	Metabolismo de PHB

O p-valor para cada gene foi calculado através do software CLC Genomics Workbench 4.8, através do teste de Baggerly e colaboradores (BAGGERLY *et al.*, 2003).

O nitrito produzido pelas nitrato redutases em *H. seropedicae* é possivelmente utilizado como substrato pela provável nitrito redutase codificada pelos genes *nirBD* e convertido a amônio. Este, por sua vez, é então incorporado em biomoléculas provavelmente através da via que utiliza a enzima glutamato sintase, já que os genes que codificam para este complexo enzimático estão induzidos.

Além do metabolismo de nitrogênio, os genes *phbAA₂BF* e *phaCZ*, os quais estão envolvidos com o metabolismo de PHB, também estão induzidos. Provavelmente a indução destes genes em nitrato ocorreu em resposta aos menores níveis de nitrogênio na condição nitrato (10mM) em comparação com a condição amônio (20mM). Muitas bactérias acumulam polihidroxialcanoatos, entre eles PHB, em resposta a excesso de carbono ou em condições em que um nutriente, nitrogênio neste caso, está limitante (HERVÁS *et al.*, 2008).

Os genes *uspA* e *cspD*, relacionados ao estresse ambiental, provavelmente estão induzidos como resultado de ser o amônio e não o nitrato a fonte preferida de nitrogênio para *H. seropedicae*.

4.2 ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS COM METABOLISMO DE NITRATO DE *H. seropedicae* ATRAVÉS DE ENSAIOS DE β -GALACTOSIDASE

O transcriptoma realizado neste trabalho mostrou como o nitrato influencia a expressão de muitos genes de *H. seropedicae*, em particular aqueles envolvidos com metabolismo de nitrato. Depois de ter essa visão global, a regulação da região promotora dos operons *narXL*, *narK₁UGHJlmoaA* e *nasFED* foi submetida a análises mais minuciosas. Primeiramente foram realizadas análises *in silico*, as quais complementaram análises realizadas em trabalhos anteriores (ALVES, 2006; BONATO, 2009; GUIMARÃES, 2011). Além disso, foram realizados ensaios de β -galactosidase na estirpe selvagem com o objetivo de avaliar como as regiões promotoras desses operons são reguladas em resposta a diferentes fontes de nitrogênio e sob diferentes condições de aeração das culturas. Depois de estabelecer as condições do experimento, os ensaios de β -galactosidase também foram realizados em estirpes mutantes de *H. seropedicae* as quais contêm as proteínas regulatórias Fnr, NtrC, NtrY e NarL deletadas ou truncadas. O objetivo deste último experimento foi o de avaliar o papel dessas proteínas regulatórias sobre a expressão das regiões promotoras de *narXL*, *narK₁UGHJlmoaA* e *nasFED*. As estirpes mutantes *ntrC⁻*, *ntrY⁻* e *narL⁻* foram selecionadas porque elas não são capazes de crescer em nitrato como única fonte de nitrogênio. Por outro lado, a estirpe que contém o gene *fnr* mutado foi selecionada porque foi observado que a expressão dos operons *narXL* e *narK₁UGHJlmoaA* é induzida em baixos níveis de oxigênio. Esta estirpe mutante selecionada contém deleção nos três genes *fnr* (*fnr₁*, *fnr₂* e *fnr₃*) e será referida como Fnr⁻.

4.2.1 Operon *narXL*

As proteínas NarX e NarL, membros da família do sistema de dois componentes, estão envolvidas na regulação de vários genes relacionados com o metabolismo de nitrato (MORENO-VIVIÁN *et al.*, 1999). A regulação de expressão dos genes que codificam estas proteínas é bem conhecida em *E. coli* e *P. aeruginosa*. Em *H. seropedicae* sabe-se que estes genes constituem o operon *narXL* e que as proteínas NtrC e NtrX podem estar envolvidas na regulação deste operon (ALVES, 2006; OSAKI, 2009).

Com o intuito de estudar a regulação deste operon em *H. seropedicae*, a região promotora de *narXL* foi analisada *in silico* e o perfil de expressão desse operon foi avaliado através de ensaios de β -galactosidase.

Na região promotora de *narXL*, são encontrados possíveis sítios de ligação para as proteínas NtrC e NarL, além de sítios de ligação para os fatores σ^{54} e σ^{70} (**CCGGACTG-N₄-TTGCA¹; TTCCCA-N₁₈-TAAGAA**, respectivamente) (FIGURA 13). Não foi identificada uma boa sequência candidata para sítio de ligação para a proteína Fnr. Além disso, não foi possível determinar o início de transcrição do gene *narX* através do transcriptoma devido à sobreposição dos *reads* correspondentes ao gene à montante do início do gene *narX* (*moaA*).

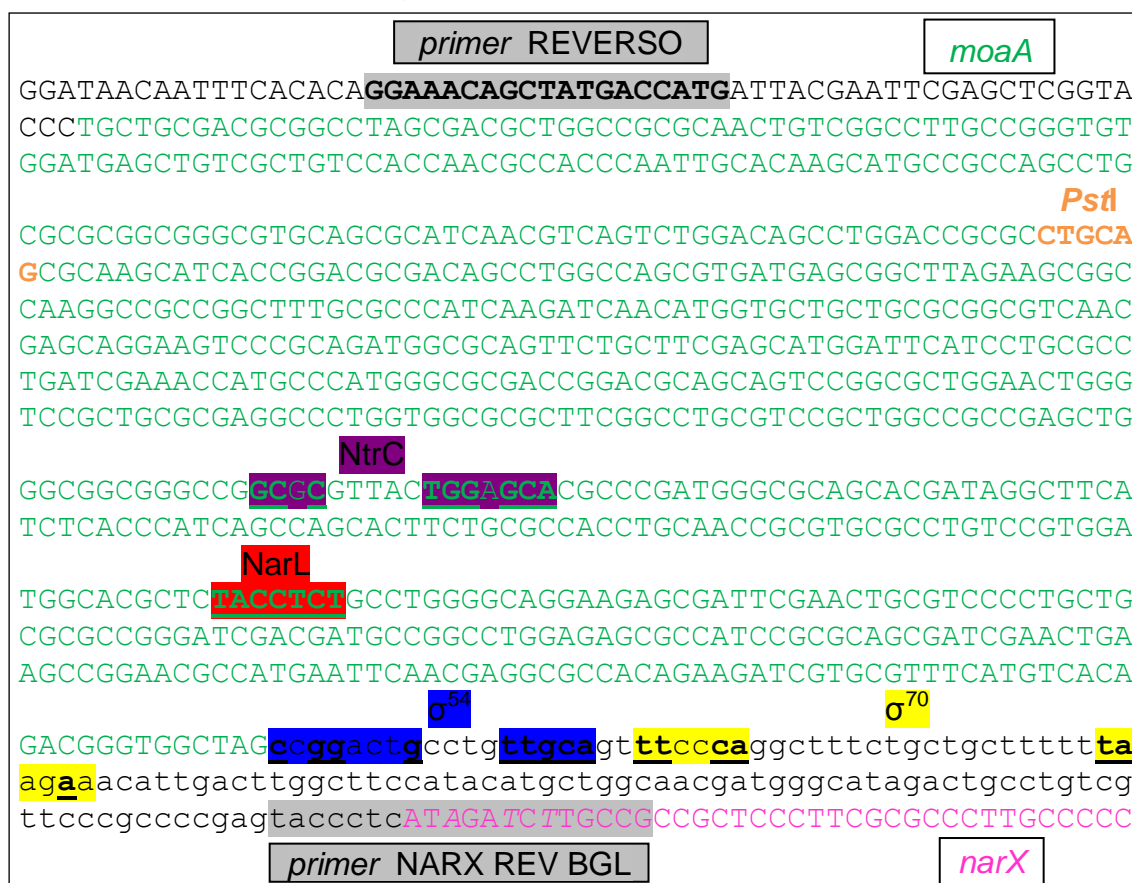


FIGURA 13 – REGIÃO REGULATÓRIA DO OPERON *narXL* DE *H. seropedicae*, CONTIDA NO PLASMÍDEO pUC18-HS05099B08

Em letras maiúsculas e em preto: sequência correspondente ao vetor pUC18; em letras maiúsculas e em verde e rosa: sequências correspondentes a região codificadora dos genes *moaA* e *narX*, respectivamente. Regiões sombreadas: em cinza: *primers* reverso e NARX REV BGL, respectivamente (em itálico, sítio de restrição de *Bgl*II); em roxo e vermelho: possíveis sítios de ligação reconhecidos pelas proteínas NtrC e NarL, respectivamente; em azul: possível sítio de ligação de σ^{54} ; em amarelo: possível sítio de ligação de σ^{70} .

¹ As bases em negrito e sublinhadas correspondem a bases conservadas de acordo com os sítios consenso apresentados na seção 3.8.

Para realização dos ensaios de β -galactosidase, fragmento de DNA contendo a região promotora do operon *narXL* foi clonado no vetor pPW452. Para obter este plasmídeo, a região regulatória do operon foi amplificada a partir do plasmídeo pUC18-HS05099B08 (GENOPAR) através dos *primers* reverso, que anela no vetor pUC18, e NARX REV BGL, que insere o sítio de restrição reconhecido pela enzima *Bgl*II (FIGURA 13). O produto de PCR foi clonado no vetor pTZ57R/T, dando origem ao plasmídeo pTZ-B08 rev/rev. A região clonada foi sequenciada e nenhuma mutação foi identificada. Em seguida, o plasmídeo pTZ-B08 rev/rev foi digerido com as enzimas de restrição *Pst*I e *Bgl*II. O produto com 721 pares de bases foi clonado no vetor pPW452 digerido com as mesmas enzimas, dando origem ao plasmídeo denominado pPW-*narXL* P/B. A clonagem foi confirmada por digestão do plasmídeo pPW-*narXL* P/B com as enzimas *Pst*I e *Bgl*II (FIGURA 14), que liberou um fragmento com tamanho esperado (721 pares de base). Esse plasmídeo foi transferido por conjugação para *H. seropedicae* e nas estirpes mutantes *Fnr*⁻, *ntrC*⁻, *ntrY*⁻ e *narL*⁻ para realização de ensaios de β -galactosidase.

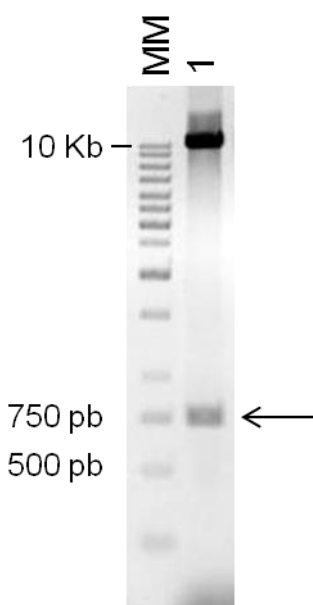


FIGURA 14 – CONFIRMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pPW-*narXL* P/B

Perfil eletroforético em gel de agarose 1% em TAE 1x. MM: marcador molecular (Fermentas); linha 1: plasmídeo pPW-B08 P/B digerido com as enzimas de restrição *Pst*I e *Bgl*II. A seta indica o fragmento de inserto liberado. A banda com aproximadamente 10 mil pares de base (Kb) corresponde ao vetor pPW452.

Os primeiros ensaios de β -galactosidase foram realizados com o objetivo de estabelecer o perfil de expressão da região promotora de *narXL* ao longo do tempo. A estirpe selvagem SmR1 contendo o plasmídeo pPW-*narXL* P/B, foi cultivada durante 24 horas em diferentes fontes de nitrogênio e em aerobiose. Ao longo do tempo, foram retiradas alíquotas para realização de ensaios de β -galactosidase (0, 2, 4, 6, 8, 10 e 24 horas) (FIGURA 15A). Como resultado, foi observado até seis horas de ensaio e em todas as condições, apenas expressão basal (cerca de 200 unidades Miller). Nas condições com glutamato 5 mM ou com nitrito a expressão basal foi mantida ao longo das 24 horas de experimento. Entretanto, na condição com alto nitrogênio (amônio 20 mM) e as três condições contendo nitrato foi observado aumento de expressão a partir de seis horas, atingindo até cerca de 1000 unidades Miller. Esse aumento de expressão tardio possivelmente foi estimulado pela diminuição na oxigenação das culturas devido ao crescimento, a qual pode atingir um nível crítico para indução de expressão do promotor de *narX*.

Para investigar o efeito de baixa oxigenação das culturas sobre a expressão do promotor de *narX* ao longo do tempo, um novo ensaio de β -galactosidase foi realizado conforme descrito anteriormente, mas em condição com nível de oxigênio mais baixo. Para tanto, a fase gasosa do frasco foi substituída por nitrogênio contendo uma concentração inicial de oxigênio de 5% (Item 3.10, condição microaerobiose (5% de oxigênio inicial)) (FIGURA 15B). Conforme esperado, a expressão de *narXL* foi induzida na condição com baixo nível de oxigênio já a partir de 2h. Entretanto, essa indução de expressão não parece ser dependente da fonte de nitrogênio, já que o perfil de expressão é semelhante em todas as condições, mesmo em nitrito adicionado de glutamato e glutamato apenas.

Considerando os ensaios apresentados na figura 15, foi escolhido o tempo de seis horas para realização dos demais ensaios com estirpes mutantes e a DO₆₀₀ inicial foi diminuída para 0,05 para evitar o efeito de baixo oxigênio na condição aerobiose.

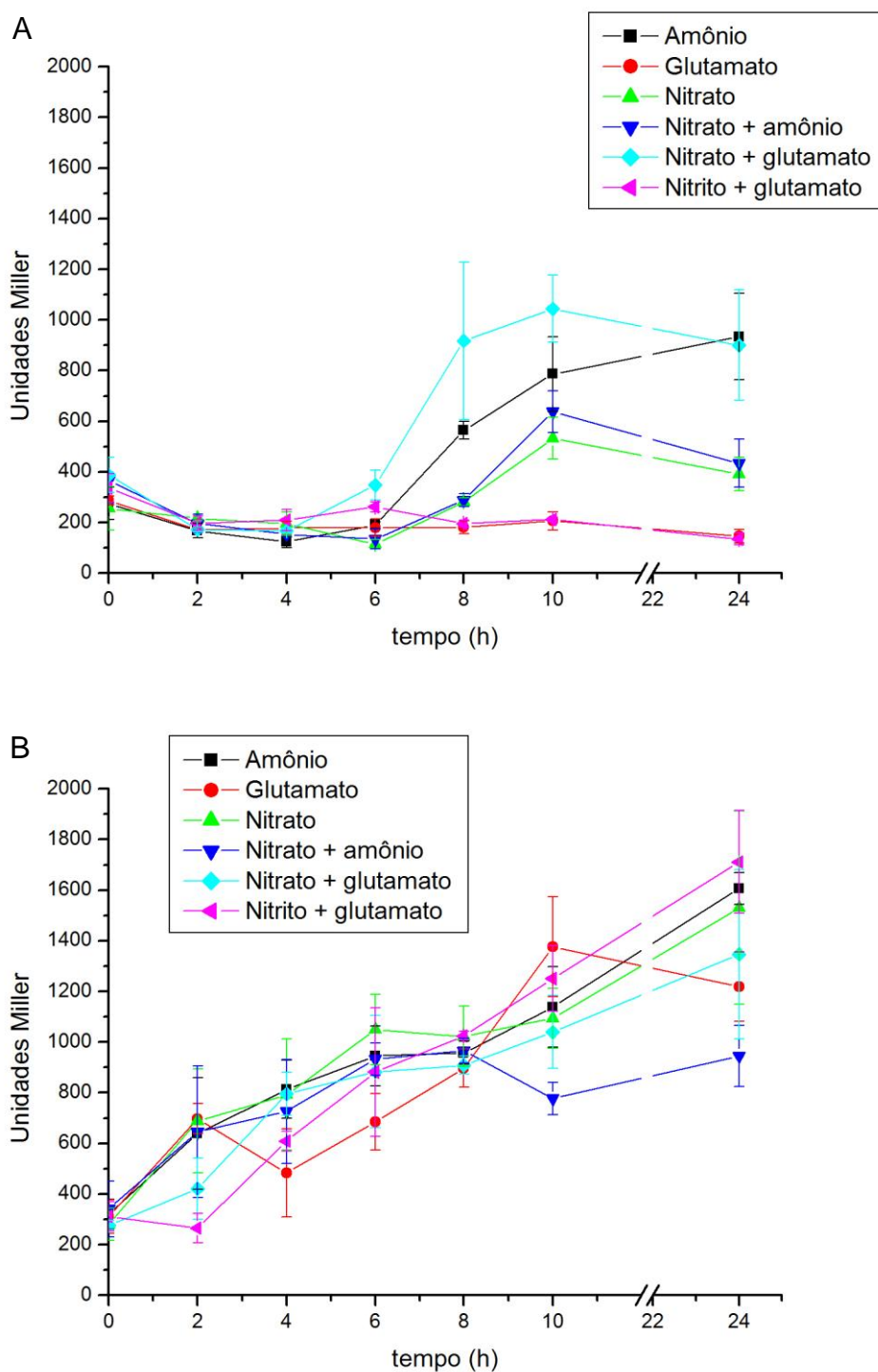


FIGURA 15 – PERFIL DE EXPRESSÃO DO OPERON *narXL* DE *H. seropedicae* SmR1 AO LONGO DO TEMPO

A estirpe SmR1 contendo o plasmídeo pPW-B08 P/B foi inoculada a D.O.₆₀₀ inicial de 0,1 e mantida a 30°C sob agitação durante 24 horas. Foram feitos inóculos em meio NFb-malato, em seis fontes de nitrogênio diferentes: amônio 20 mM, nitrato 10 mM, glutamato 5 mM, nitrato 10 mM + amônio 1 mM, nitrato 10 mM + glutamato 1 mM e nitrito 1 mM + glutamato 5 mM. Nos tempos indicados foram retiradas alíquotas para o ensaio de β -galactosidase. As barras de erro correspondem ao desvio padrão das médias de quatro experimentos independentes. A) condição aerobiose; B) condição microaerobiose (5% de oxigênio inicial) (conforme item 3.10).

Após determinação das condições dos ensaios as estirpes selvagem, *Fnr*⁻, *ntrC*⁻, *ntrY*⁻ e *narL*⁻, contendo o plasmídeo pPW-*narXL* P/B foram cultivadas por seis horas em condição aerobiose e em microaerobiose (5% de oxigênio inicial). Além disso, foram utilizadas apenas três fontes de nitrogênio diferentes: (1) amônio 20 mM; (2) glutamato 5 mM e (3) nitrato 10 mM + amônio 1 mM. Esta última condição, ao invés de nitrato apenas, foi escolhida para avaliar o efeito do nitrato sobre a expressão de *narXL*, já que os mutantes *ntrC*⁻, *ntrY*⁻ e *narL*⁻ não são capazes de crescer em nitrato como única fonte de nitrogênio. Nas estirpes selvagem e *Fnr*⁻, os ensaios também foram realizados em nitrato apenas. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas em relação a condição nitrato suplementada com amônio (FIGURA 16A).

Como resultado, verificou-se que o nível de expressão de *narXL* é maior quando o nível de oxigenação na célula é menor (FIGURA 16), como observado anteriormente (FIGURA 15B). Entretanto, em glutamato e baixo oxigênio, o promotor de *narXL* é cerca de duas vezes mais induzido em relação à amônio ou nitrato + amônio, também em baixa oxigenação. Este efeito não tinha sido observado anteriormente. É importante ressaltar que as atividades mostradas na figura 16 foram reportadas como atividade específica e não em Unidades Miller, como na Figura 15.

A proteína Fnr parece ser o principal ativador do operon *narXL*, já que no mutante *Fnr*⁻ não houve expressão significativa (FIGURA 16A). Como se sabe que Fnr regula a expressão de diversos genes em resposta a baixa concentração de oxigênio (SPIRO; GUEST, 1990), esta proteína era a candidata mais provável a ativador do operon *narXL*. Entretanto, como não foi encontrado um bom sítio consenso reconhecido por Fnr na região promotora de *narXL*, seu efeito ativador provavelmente é indireto.

O perfil de expressão de *narXL* nos mutantes *ntrC*⁻, *ntrY*⁻ e *narL*⁻ é semelhante ao selvagem (FIGURAS 16B, 16C e 16D), exceto que a indução em glutamato e baixo oxigênio não é observado em nenhum deles. Como a proteína NtrC tem capacidade de ativar a transcrição de genes alvo em condições de limitação de nitrogênio, é possível esta proteína atue como ativador de expressão do operon *narXL* nesta condição. O efeito ativador de NtrY/NtrX e NarL pode ser indireto, via proteína NtrC, ou seja, NtrC ativaria a transcrição de *ntrY* (ALVES, 2006) e *narL*, e o produto destes genes ativaria a transcrição de *narXL*. Além disso,

as proteínas NtrY/NtrX parece exercer um efeito repressor sobre *narXL* na presença de nitrato, independente do nível de oxigenação do meio (FIGURA 16C).

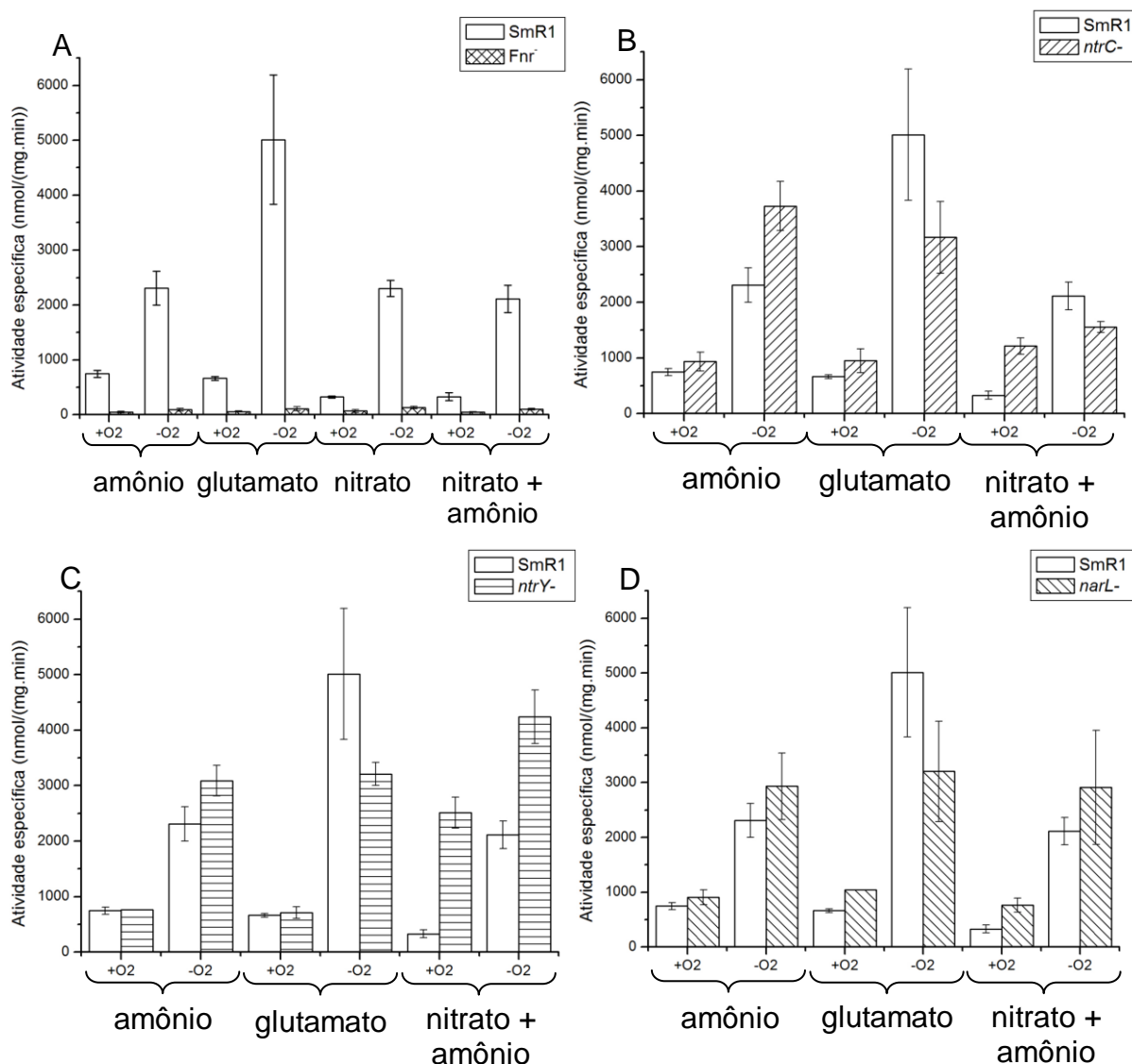


FIGURA 16 – PERFIL DE EXPRESSÃO DO OPERON *narXL* NA ESTIRPE SELVAGEM *H. seropedicae* SmR1 E ESTIRPES MUTANTES

Estirpe SmR1 e estirpes mutantes *Fnr⁻*, *ntrC⁻*, *ntrY⁻* e *narL⁻* contendo o plasmídeo pPW-*narXL* foram inoculadas a D.O.₆₀₀ inicial de 0,1 e mantida a 30°C sob agitação durante 6 horas. As estirpes foram cultivadas em meio NFb-malato, em três fontes de nitrogênio diferentes: amônio 20 mM, glutamato 5 mM e nitrato 10 mM + amônio 1 mM. Os ensaios foram realizados em condição microaerobiose (5% de oxigênio inicial) (-O₂) ou aerobiose (+O₂), conforme indicado. As figuras mostram comparação de estirpe selvagem com (A) *Fnr⁻*, (B) *ntrC⁻*, (C) *ntrY⁻* e (D) *narL⁻*. A atividade específica foi expressa em nmol de o-nitrofenol produzido por minuto por miligrama de proteína. Os desvios padrões correspondem a média de três experimentos independentes, realizados em triplicata biológica.

Juntos, estes resultados mostram que a regulação de expressão da região promotora de *narXL* é complexa. Apesar de ter sido demonstrado anteriormente que a expressão do operon de *narXL* não é afetada por oxigênio (ALVES, 2006), vários

resultados apresentados neste trabalho sugerem fortemente que a expressão dele é induzida em condição limitante de oxigênio e de forma dependente de Fnr. Entretanto, como não foi possível encontrar um bom candidato a consenso de ligação para Fnr na região promotora de *narX*, provavelmente essa indução é indireta ou o consenso de Fnr de *E. coli* é diferente do consenso de Fnr de *H. seropedicae*.

Anteriormente também foi demonstrado que a expressão de *narX* é induzida por NtrC e NtrY/NtrX na presença de nitrato (ALVES, 2006). Entretanto, neste trabalho foi encontrado que estas duas proteínas têm papel ativador, mas em resposta a baixa concentração de nitrogênio (glutamato 5 mM) (FIGURAS 16B e 16C). Na presença de nitrato, NtrC não parece ser importante para regulação de *narX*, enquanto que NtrY parece ter papel repressor. Entretanto, no experimento conduzido neste trabalho a condição nitrato é suplementada por amônio, o que pode ter interferido no resultado do experimento. Para uma melhor averiguação do papel de NtrC, NtrY e também de NarL sobre a regulação de *narX*, em experimentos futuros, os ensaios de β -galactosidase devem ser conduzidos na presença de nitrato apenas.

Tanto em *E. coli* como em *P. aeruginosa*, o promotor de *narXL* é induzido por nitrato e anaerobiose (DARWIN; STEWART, 1995; SCHREIBER *et al.*, 2007). Em *H. seropedicae*, conforme discutido anteriormente, os ensaios de β -galactosidase mostram que a transcrição de *narXL* é induzida por baixa aeração. Em relação a nitrato, tanto dados de RT-PCR (GUIMARÃES, 2011) como do transcriptoma (Tabela 5) mostraram que a transcrição de *narX* é induzida por este composto. Entretanto, os dados de β -galactosidase mostraram que, em relação à condição com amônio, o operon *narXL* é induzido por glutamato, mas não por nitrato (FIGURAS 15 e 16).

Em *E. coli*, a expressão de *narXL* não depende de Fnr, ao contrário do que ocorre em *P. aeruginosa*. Neste último organismo, assim como ocorre em *H. seropedicae* (FIGURA 16A), Anr, homólogo de Fnr, é requerido para expressão máxima de *narXL*. Por outro lado, em *E. coli*, a expressão de *narXL* sofre auto-regulação, ao contrário do que ocorre em *P. aeruginosa* e *H. seropedicae* (DARWIN; STEWART, 1995; SCHREIBER *et al.*, 2007). De modo geral, percebe-se que a regulação de *narXL* de *H. seropedicae* é muito semelhante ao observado para *P. aeruginosa*.

4.2.2 Operon *narK₁UGHJlmoaA*

Os genes *narK₁* e *narU* codificam para proteínas transmembrana que provavelmente realizam transporte de nitrato e/ou nitrito. Em *H. seropedicae*, estes genes estão localizados à montante dos genes que codificam para a nitrato redutase respiratória, possivelmente constituindo o operon *narK₁UGHJlmoaA*. Como a regulação deste operon não é conhecida neste organismo, a região à montante de *narK₁U* foi analisada *in silico*. Além disso, a regulação deste promotor foi analisada através de ensaios de β -galactosidase.

Nas análises *in silico* da região à montante de *narK₁* foram identificados sítios de ligação pouco conservados reconhecidos pelas proteínas regulatórias NtrC e Fnr, além de sítios reconhecidos por NarL (FIGURA 17). O provável início de transcrição deste gene foi identificado e está localizado a 26 pares de base do início de tradução proposto de *narK₁*. Através do início de transcrição, foi identificado um provável sítio de ligação do fator σ^{70} (ATGGCC-N₁₆-TAAGCT). Nenhuma sequência reconhecida pelo fator σ^{54} foi identificada.

Para realização dos ensaios de β -galactosidase, a sequência correspondente à região promotora de *narK₁U* foi clonada no vetor pMP220. O plasmídeo pCR2.1-*narK₁K₂* (*int*), que contém a região promotora destes genes, foi digerido com as enzimas *Bgl*II e *Pst*I. O fragmento correspondente à região promotora do operon, com 711 pares de base, foi purificado do gel e clonado no vetor pMP220 digerido com as mesmas enzimas. A obtenção do plasmídeo, denominado de pMP-*narK₁U*, foi confirmada através de digestão com as enzimas *Bgl*II e *Pst*I (FIGURA 18), que liberou um fragmento do tamanho esperado (711 pares de base), e através de reação de sequenciamento. Esse plasmídeo construído foi conjugado em *H. seropedicae* e nas estirpes mutantes, Fnr⁻, *ntrC*⁻, *ntrY* e *narL*⁻ para realização dos ensaios de β -galactosidase.

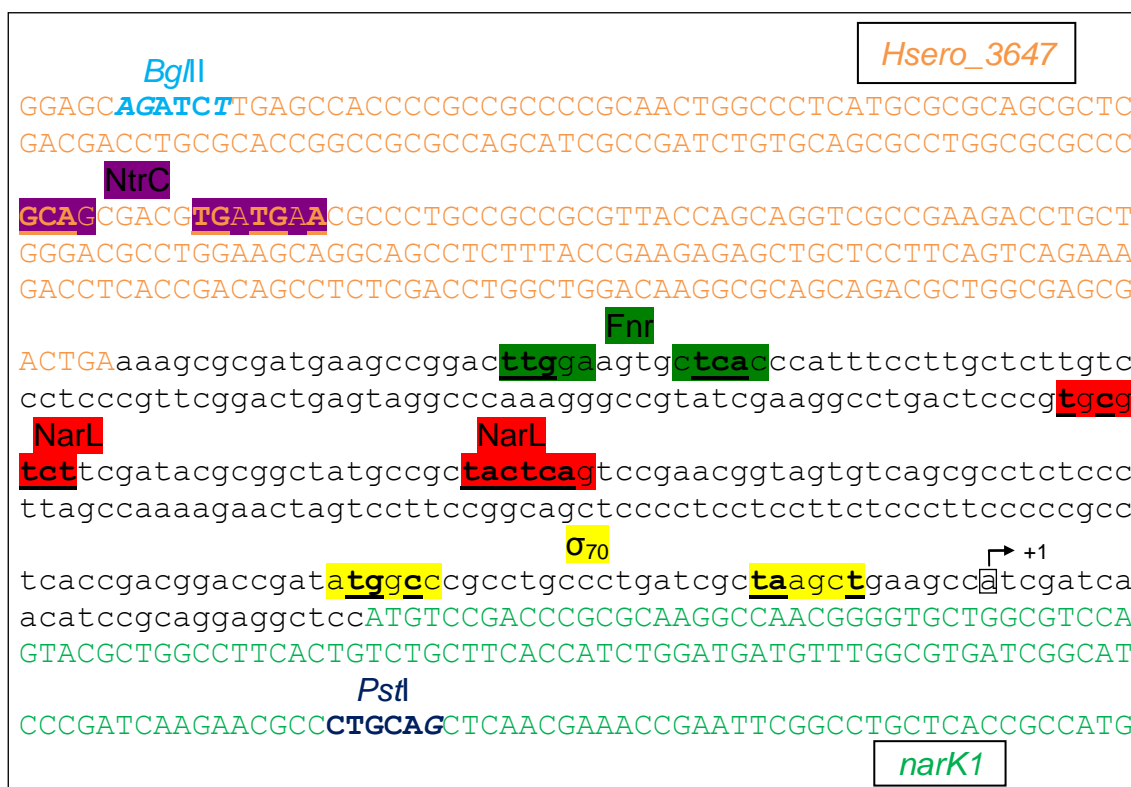


FIGURA 17 – REGIÃO REGULATÓRIA DO OPERON *narK₁UGHJlmoaA* DE *H. seropedicae*

Em letras maiúsculas, região codificadora dos genes. Em laranja e verde: sequências correspondentes aos genes *Hsero_3647* e *narK1*, respectivamente; em azul claro: sítio de restrição de *BglII*; em azul escuro: sítio de restrição de *PstI*. Regiões realçadas em roxo, verde e vermelho: possíveis sítios de ligação reconhecidos pelas proteínas NtrC, Fnr e NarL, respectivamente; em amarelo: possível sítio de ligação de σ^{70} . O provável início de transcrição está indicado pela seta.

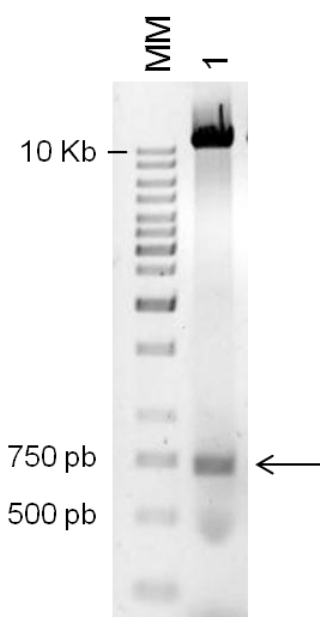


FIGURA 18 – CONFIRMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pMP-*narK₁U*

Perfil eletroforético em gel de agarose 1% em TAE 1x. MM: marcador molecular (Fermentas); linha 1: plasmídeo pMP-*narK₁U* digerido com as enzimas de restrição *BglII* e *PstI*. A seta indica o fragmento de inserto liberado que contém 711 pb. A banda com aproximadamente 10 Kb corresponde ao vetor pMP220.

Primeiramente os ensaios de β -galactosidase foram realizados com estirpe selvagem contendo o plasmídeo pMP-*narK₁U*. Foi observado nível de expressão significativo apenas em condições com baixo nível de oxigenação das culturas (dados não mostrados). Com isso, o perfil de expressão deste promotor foi avaliado ao longo do tempo em condição de microaeração (1:2), ou seja, com volume de cultura correspondente à metade da capacidade do frasco (ver seção 3.10) (FIGURA 19). Foi observada expressão do promotor apenas nas condições que continham nitrato. Máxima expressão é atingida entre seis e oito horas, com queda a partir deste ponto. Com isso, foi escolhido um tempo de seis horas para realização dos demais ensaios.

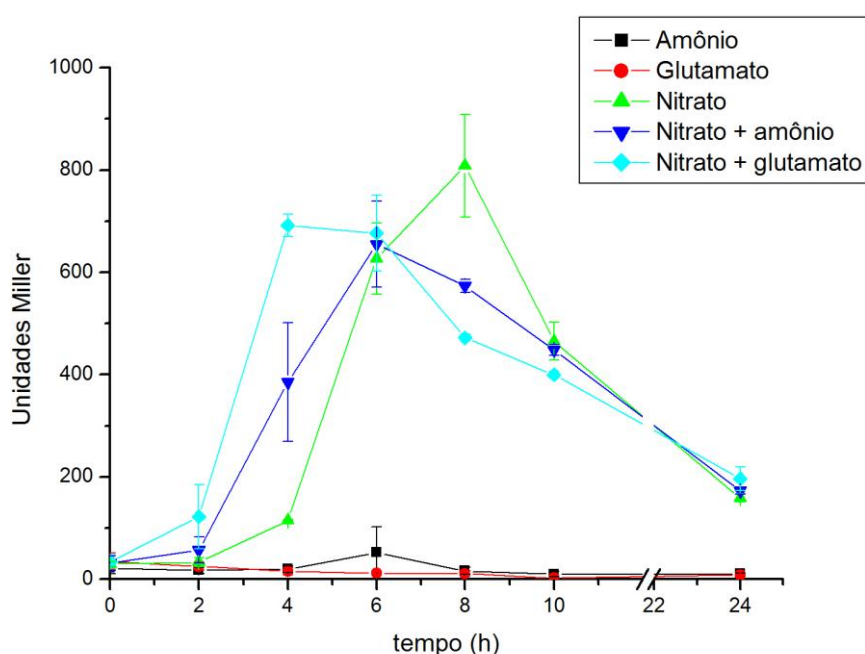


FIGURA 19 – PERFIL DE EXPRESSÃO DO OPERON *narK₁UGHJImoaA* DE *H. seropedicae* SmR1 AO LONGO DO TEMPO

A estirpe SmR1 contendo o plasmídeo pMP-*narK₁U* foi inoculada a D.O.₆₀₀ inicial de 0,1 e mantida a 30°C sob agitação durante 24 horas. Foram feitos inóculos em meio NFb-malato em cinco fontes de nitrogênio diferentes: amônio 20 mM, nitrato 10 mM, glutamato 5 mM, nitrato 10 mM + amônio 1 mM e nitrato 10 mM + glutamato 1 mM. Nos tempos indicados foram retiradas alíquotas para o ensaio de β -galactosidase. O ensaio foi realizado em condição microaeração (1:2). As barras de erro correspondem ao desvio padrão das médias de três experimentos independentes.

Em seguida, foram realizados ensaios de β -galactosidase em várias concentrações iniciais de oxigênio (FIGURA 20) utilizando nitrato como fonte de nitrogênio. Este ensaio também foi realizado em nitrato adicionado de glutamato 1 mM, condição onde o perfil de expressão de *narK₁U* se assemelha à condição que contém apenas nitrato. Como resultado, em aerobiose não foi observado atividade

do promotor, enquanto que nas condições nas quais a aeração é diminuída, é observado um aumento da expressão. Em concentração de oxigênio inicial de 15%, verificou-se uma maior atividade na condição com nitrato suplementado com glutamato 1 mM em relação a nitrato apenas. Provavelmente, essa maior atividade na primeira condição é resultante da maior densidade óptica na cultura, promovida pela presença de duas fontes de nitrogênio, o que contribuiu para diminuir ainda mais a concentração de oxigênio no meio.

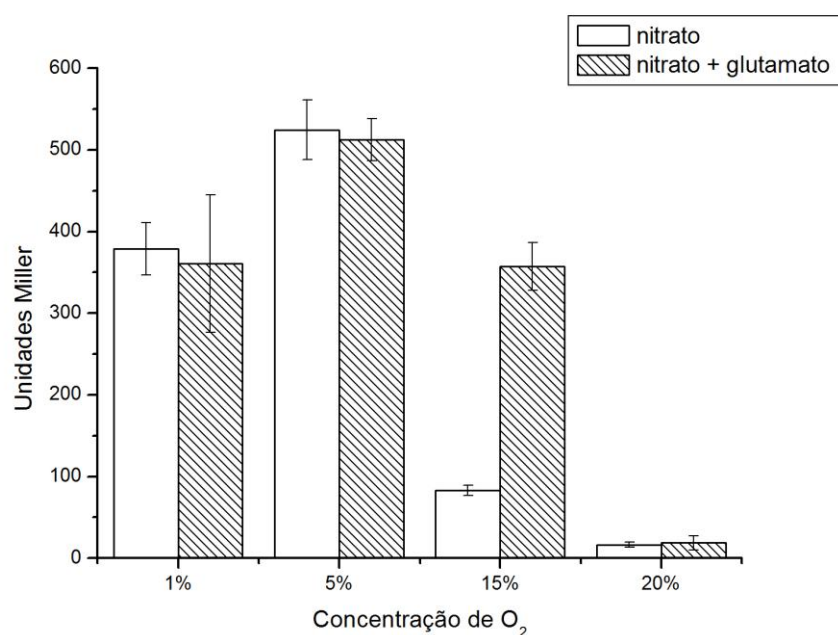


FIGURA 20 – PERFIL DE EXPRESSÃO DO OPERON *narK₁UGHImoaA* DE *H. seropedicae* SmR1 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OXIGÊNIO INICIAL

A estirpe SmR1 contendo o plasmídeo pMP-*narK₁U* foi inoculada a D.O.₆₀₀ inicial de 0,1 e mantida a 30°C sob agitação durante 6 horas. Foram feitos inóculos em meio NFb-malato em duas fontes de nitrogênio diferentes: nitrato 10 mM e nitrato 10 mM + glutamato 1 mM. O ensaio foi realizado em diferentes concentrações de oxigênio iniciais (1, 5 e 15%). Como controle foi utilizada cultura mantida sob oxigenação constante (20%). As barras de erros correspondem ao desvio padrão das médias de dois experimentos independentes.

A atividade do promotor é máxima entre 1% e 5% de oxigênio inicial e não houve diferenças significativas entre as fontes de nitrogênio utilizadas nestas condições. Como o crescimento das culturas foi muito baixo em concentração de oxigênio de 1%, para realização dos demais ensaios foi escolhida concentração inicial de 5% de oxigênio.

Depois de estabelecer as condições do ensaio, estirpes selvagem e mutantes *Fnr⁻*, *ntrC⁻*, *ntrY⁻* e *narL⁻* foram cultivadas por seis horas, em condição

microaerobiose (5% de oxigênio inicial) ou aerobiose e em três fontes de nitrogênio: (1) amônio 20 mM, (2) glutamato 5 mM e (3) nitrato 10 mM + glutamato 1 mM. Como realizado para os ensaios com a região promotora de *narXL*, a condição nitrato + glutamato foi utilizada ao invés de nitrato apenas, porque os mutantes *ntrC*⁻, *ntrY*⁻ e *narL*⁻ não são capazes de crescer em nitrato como única fonte de nitrogênio.

Como observado anteriormente (FIGURAS 19 e 20), os resultados apresentados na figura 21 mostraram que a expressão da região promotora de *narK₁U* foi induzida apenas em baixo oxigênio e na presença de nitrato. Essa indução de expressão não é visualizada quando o ensaio foi realizado na estirpe mutante Fnr⁻ (FIGURA 21A). Este é um forte indício de que a indução de expressão de *narK₁U* em resposta a nitrato e baixo oxigênio é dependente de Fnr.

No ensaio realizado com o mutante *ntrC*⁻ (FIGURA 21B) ocorreu um aumento de expressão de cerca de 2x na condição nitrato e baixo oxigênio, indício de que a proteína NtrC pode estar envolvida com a repressão de *narK₁U* nesta condição. Já no ensaio realizado com o mutante *ntrY*⁻ (FIGURA 21C), não há diferença significativa com o selvagem, o que sugere que o sistema de dois componentes NtrY/NtrX não regula esse operon. Por outro lado, a proteína NarL parece reprimir esse operon em baixo oxigênio independente da fonte de nitrogênio. Isso foi observado pela maior atividade do promotor nessas condições, no mutante *narL*⁻ (FIGURA 21D).

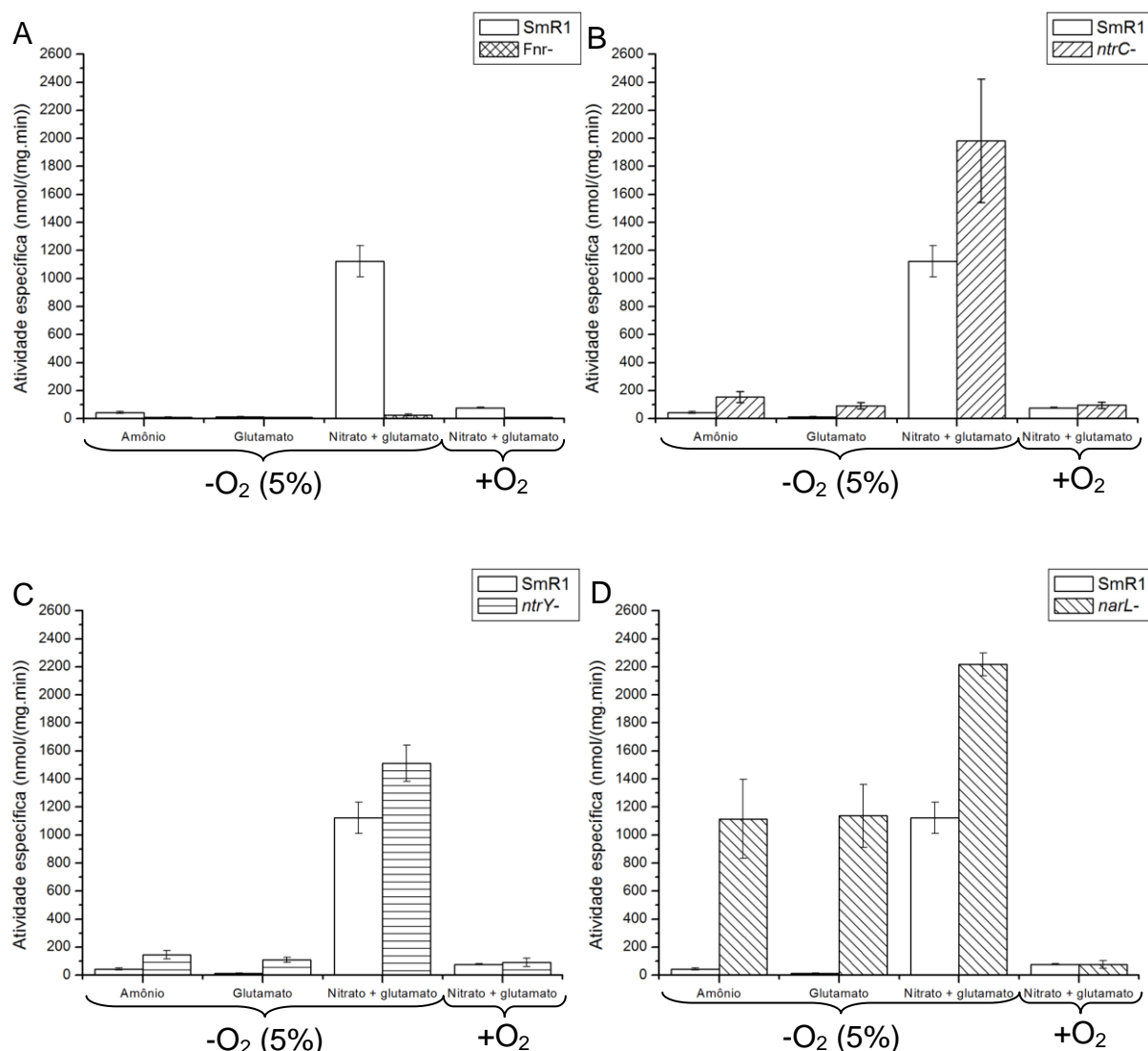


FIGURA 21 – PERFIL DE EXPRESSÃO DO OPERON *narK₁UGHJlmoaA* DE *H. seropedicae* SmR1 EM ESTIRPE SELVAGEM E ESTIRPES MUTANTES

Estirpe SmR1 e estirpes mutantes *Fnr⁻*, *ntrC⁻*, *ntrY⁻* e *narL⁻* contendo o plasmídeo pMP-*narK₁U* foram inoculadas a D.O.₆₀₀ inicial de 0,1 e mantida a 30°C sob agitação durante 6 horas. Foram feitos inóculos em meio NFB-malato em três fontes de nitrogênio diferentes: amônio 20 mM, glutamato 5 mM e nitrato 10 mM + glutamato 1 mM. O ensaio foi realizado em condição microaerobiose (5% de oxigênio inicial) (-O₂) ou aerobiose (+O₂), conforme indicado. As figuras mostram comparação de estirpe selvagem com (A) *Fnr⁻*, (B) *ntrC⁻*, (C) *ntrY⁻* e (D) *narL⁻*. A atividade específica foi expressa em nmol de o-nitrofenol produzido por minuto por miligrama de proteína. As barras de erro correspondem ao desvio padrão das médias de quatro experimentos independentes, realizados em triplicata biológica.

Em conjunto, os dados indicam que a expressão da região promotora de *narK₁UGHJlmoaA* de *H. seropedicae* é induzida por baixo oxigênio, via Fnr, e na presença de nitrato. Entretanto, o efeito de nitrato sobre a expressão do promotor à montante de *narK₁* envolve uma proteína regulatória não identificada (FIGURA 21). Em baixa oxigenação das culturas, o nível de indução deste operon em nitrato

adicionado de glutamato em relação a amônio é de quase 26 vezes. A organização e regulação desses genes em *H. seropedicae* é semelhante ao observado em *P. aeruginosa* (*narK₁K₂GHJl*) e *E. coli* (*narKGHJl*). Nas duas últimas bactérias, a expressão de *narK* é induzida em resposta a baixo nível de oxigênio e na presença de nitrato. A proteína Fnr (ou Anr, homólogo de Fnr, no caso de *P. aeruginosa*) ativa esse promotor em baixo oxigênio (KOLESNIKOW *et al.*, 1992; SCHREIBER *et al.*, 2007). Entretanto, nestas bactérias, o efeito ativador do nitrato é efetuado por NarL, ao contrário do que foi observado para *H. seropedicae*, onde observa-se que esta proteína parece reprimir a expressão do operon *narK₁U* em baixo oxigênio.

A região regulatória de *narK/narK₁* tanto de *P. aeruginosa* quanto de *E. coli*, apresenta sítio conservado para Fnr (ou Anr no caso de *P. aeruginosa*) (KOLESNIKOW *et al.*, 1992; SCHREIBER *et al.*, 2007). Por outro lado, a região correspondente em *H. seropedicae*, apresenta um sítio para Fnr mal conservado e distante do sítio de ligação para o fator σ^{70} . Com isso, é possível que o efeito de Fnr sobre a expressão de *narK₁UGHJlmoaA* seja indireto ou então que o consenso de Fnr de *E. coli* seja diferente de *H. seropedicae*.

Em *H. seropedicae*, as proteínas NtrY/NtrX não parecem ter influência sobre a expressão de *narK₁U*. Por outro lado, NtrC parece exercer um efeito repressor sobre essa região promotora.

4.2.3 Operon *nasFED*

Os genes do operon *nasFED* codificam para um transportador de nitrato/nitrito do tipo ABC. A regulação deste operon foi bem estudada em *K. pneumoniae*. Neste organismo, o operon está sujeito à regulação negativa por amônio, via sistema Ntr, e à regulação positiva por nitrato/nitrito, via proteína NasR (LIN; STEWART, 1996; WU *et al.*, 1999). Em *H. seropedicae*, a organização destes genes é semelhante à de *K. pneumoniae*. Em *H. seropedicae*, tem-se indícios de que a expressão desses genes é induzida por NtrC e NtrY/NtrX e também por nitrato (ALVES, 2006).

Foram identificados através das análises *in silico*, sequências bem conservadas de ligação à proteína NtrC, à proteína NarL e ao fator σ^{54} (**CTGGCACG-N₄-TTGCT**) (FIGURA 22). Não foi encontrado sítio de ligação para o fator σ^{70} . Com base no sítio para o fator σ^{54} e nos dados de transcriptoma, foi

possível identificar o provável início de transcrição, localizado a 147 pares de base do início de tradução proposto. Foram encontradas nessa longa região de RNA duas regiões que formam grampos estáveis (FIGURA 23), os quais podem ter um papel importante na regulação do operon *nasFED*.

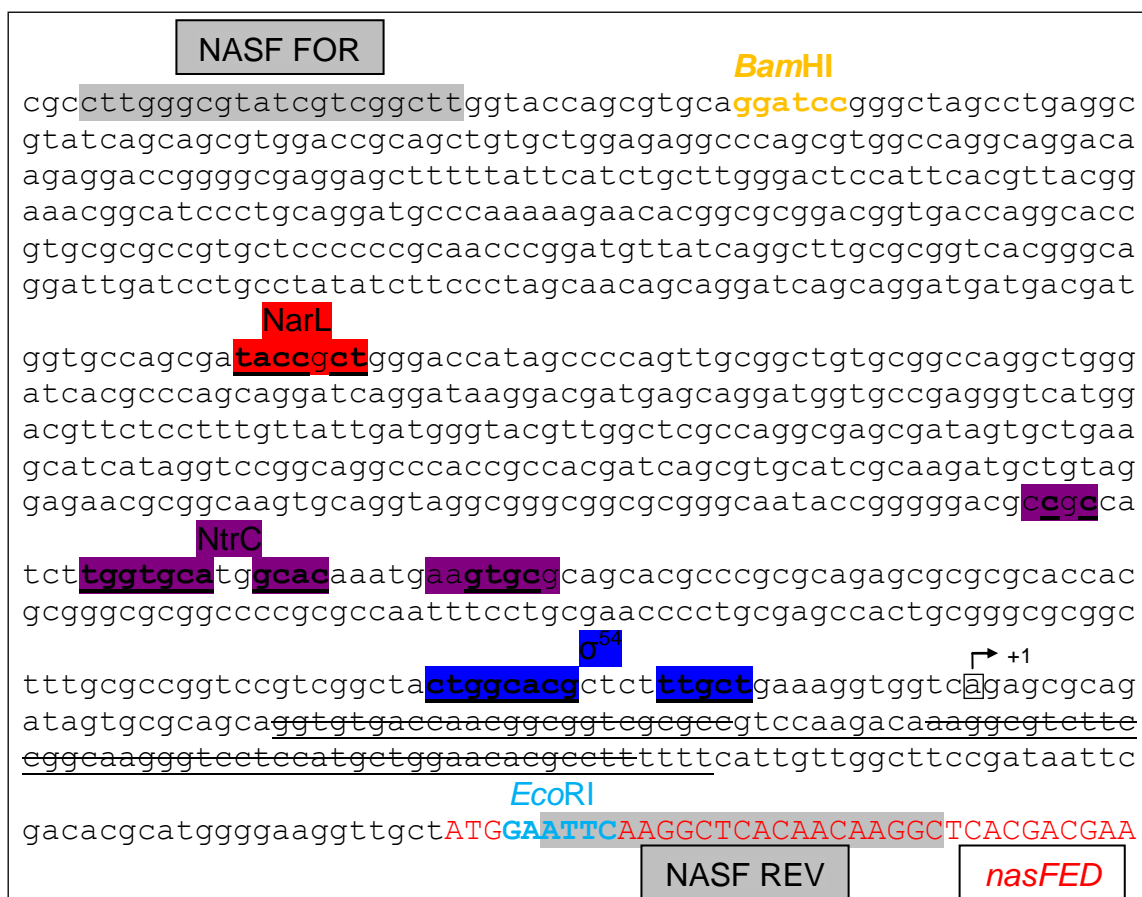


FIGURA 22 – REGIÃO REGULATÓRIA DO OPERON *nasFED* DE *H. seropedicae*. Em vermelho: região codificadora de *nasF*; em laranja: sítio de restrição de *Bam*HI; em azul claro: sítio de restrição de *Eco*RI. Regiões sombreadas: em cinza: *primers* NASF FOR e REV; em roxo e vermelho: possíveis sítios de ligação reconhecidos pelas proteínas NtrC e NarL, respectivamente; em azul, sítio reconhecido pelo fator σ^{54} . O provável início de transcrição está indicado pela seta.

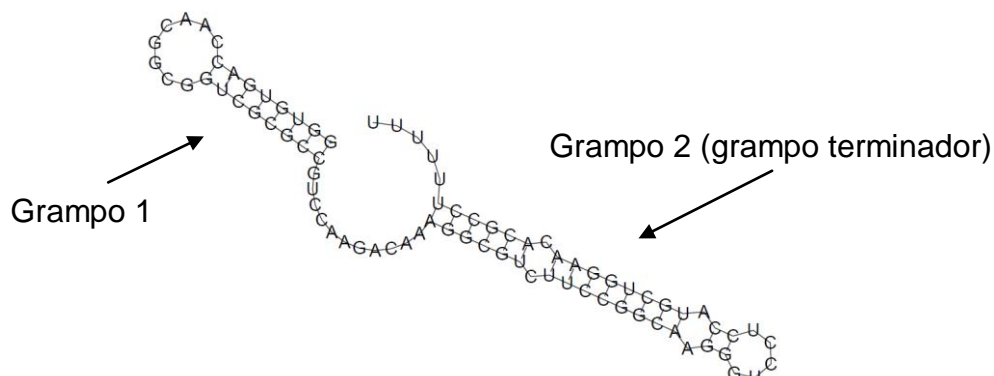


FIGURA 23 – ESTRUTURA EM GRAMPO FORMADA PELO RNA DA REGIÃO PROMOTORA DO OPERON *nasFED* DE *H. seropedicae*. A estrutura em grampo corresponde à região sublinhada na figura 22.

Como não foi identificado nenhum gene logo à montante do gene *nasF*, uma região longa contendo 973 pares de base foi amplificada através de PCR (FIGURA 22) e clonada no vetor pTZ57R/T. O inserto contido no plasmídeo construído foi sequenciado para confirmar ausência de mutações. O fragmento foi então digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI. O produto de digestão, com 916 pares de base, foi clonado entre os sítios *Bgl*II e *Eco*RI de pMP220. A clonagem foi confirmada por digestão do plasmídeo pMP-*nasFED* com as enzimas de restrição *Bgl*II e *Eco*RI (FIGURA 24). Em seguida, este plasmídeo foi conjugado em *H. seropedicae* e estirpes mutantes para realização de ensaios de β -galactosidase.

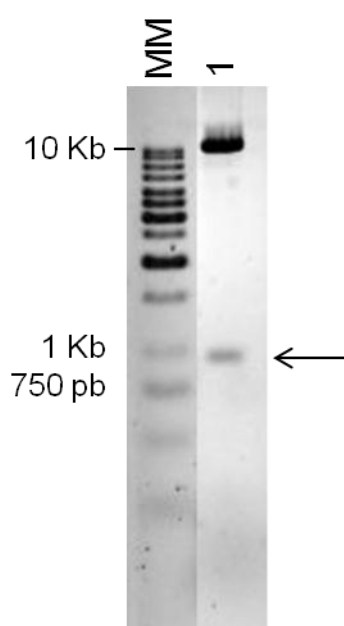


FIGURA 24 – CONFIRMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO pMP-*nasFED*
 Perfil eletroforético em gel de agarose 1% em TAE 1x. MM: marcador molecular (Fermentas); linha 1: plasmídeo pMP-*nasFED* digerido com as enzimas de restrição *Bgl*II e *Eco*RI. A seta indica o fragmento de inserto liberado. A banda com aproximadamente 10 Kb corresponde ao vetor pMP220.

Assim como realizado para as regiões promotoras *narXL* e *narK₁U*, o perfil de expressão de *nasFED* foi avaliado ao longo do tempo utilizando estirpe selvagem contendo o plasmídeo pMP-*nasFED* (FIGURA 25). De modo geral, os níveis de expressão deste promotor foram baixos, atingindo cerca de 200 unidades de Miller. Os maiores níveis de expressão foram observados nas três condições que contêm nitrato entre quatro e oito horas. Também houve aumento de expressão em baixo nitrogênio (glutamato 5 mM), mas em menor escala quando comparado com nitrato. Entretanto, após 24 horas, a região promotora de *nasFED* atingiu valor máximo. Já em alto nitrogênio (amônio 20 mM), não houve expressão significativa da região

promotora de *nasFED*. Com isso, foi escolhido tempo de seis horas para a realização dos demais ensaios. Como as estirpes mutantes *ntrC*⁻, *ntrY* e *narL*⁻ não crescem em nitrato com única fonte de nitrogênio, o efeito do nitrato sobre a expressão de *nasFED* foi avaliado através de cultivo das estirpes em nitrato 10 mM suplementado com amônio 1 mM.

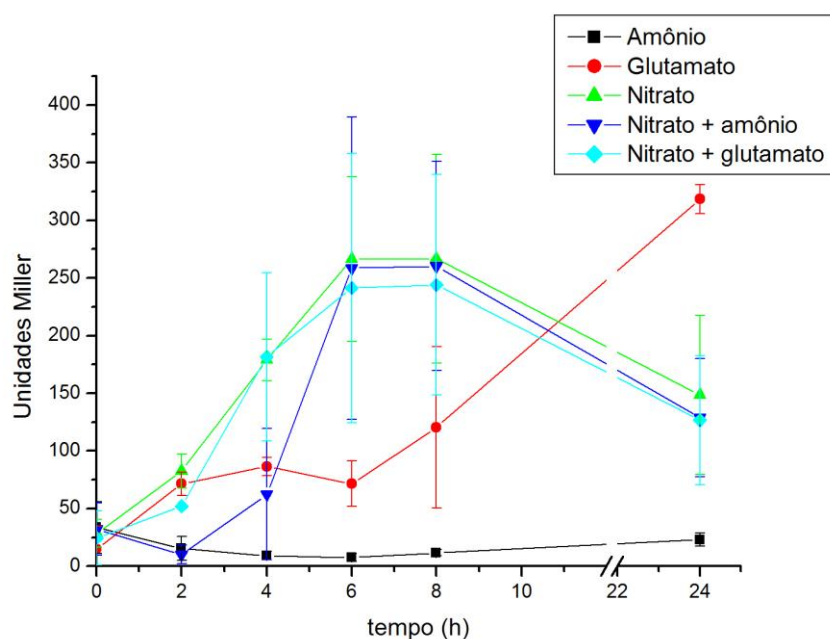


FIGURA 25 – PERFIL DE EXPRESSÃO DO OPERON *nasFED* DE *H. seropedicae* SmR1 AO LONGO DO TEMPO

A estirpe SmR1 contendo o plasmídeo pMP-*nasFED* foi inoculada a D.O.₆₀₀ inicial de 0,1 e mantida a 30°C sob agitação durante 24 horas. Foram feitos inóculos em meio NFb-malato em cinco fontes de nitrogênio diferentes: amônio 20 mM, nitrato 10 mM, glutamato 5 mM, nitrato 10 mM + amônio 1 mM e nitrato 10 mM + glutamato 1 mM. Nos tempos indicados foram retiradas alíquotas para o ensaio de β -galactosidase. O ensaio foi realizado em condição aeróbica. As barras de erros correspondem ao desvio padrão das médias de três experimentos independentes.

A figura 26 mostra os dados obtidos para os ensaios de β -galactosidase nas estirpes mutantes, comparando com estirpe selvagem. As proteínas NtrC e NtrY/NtrX muito provavelmente exercem efeito de ativador de expressão do operon *nasFED*, já que tanto em baixo nitrogênio (glutamato) e em nitrato, houve queda de atividade do promotor nas estirpes *ntrC*⁻ e *ntrY* (FIGURAS 26A e 26B). Por outro lado, na estirpe *narL*⁻ há aumento nos níveis de expressão em baixo nitrogênio, o que sugere que a proteína NarL atua como repressor desta região promotora nesta condição (FIGURA 26C). Em nitrato, NarL não tem efeito sobre a expressão de *nasFED*.

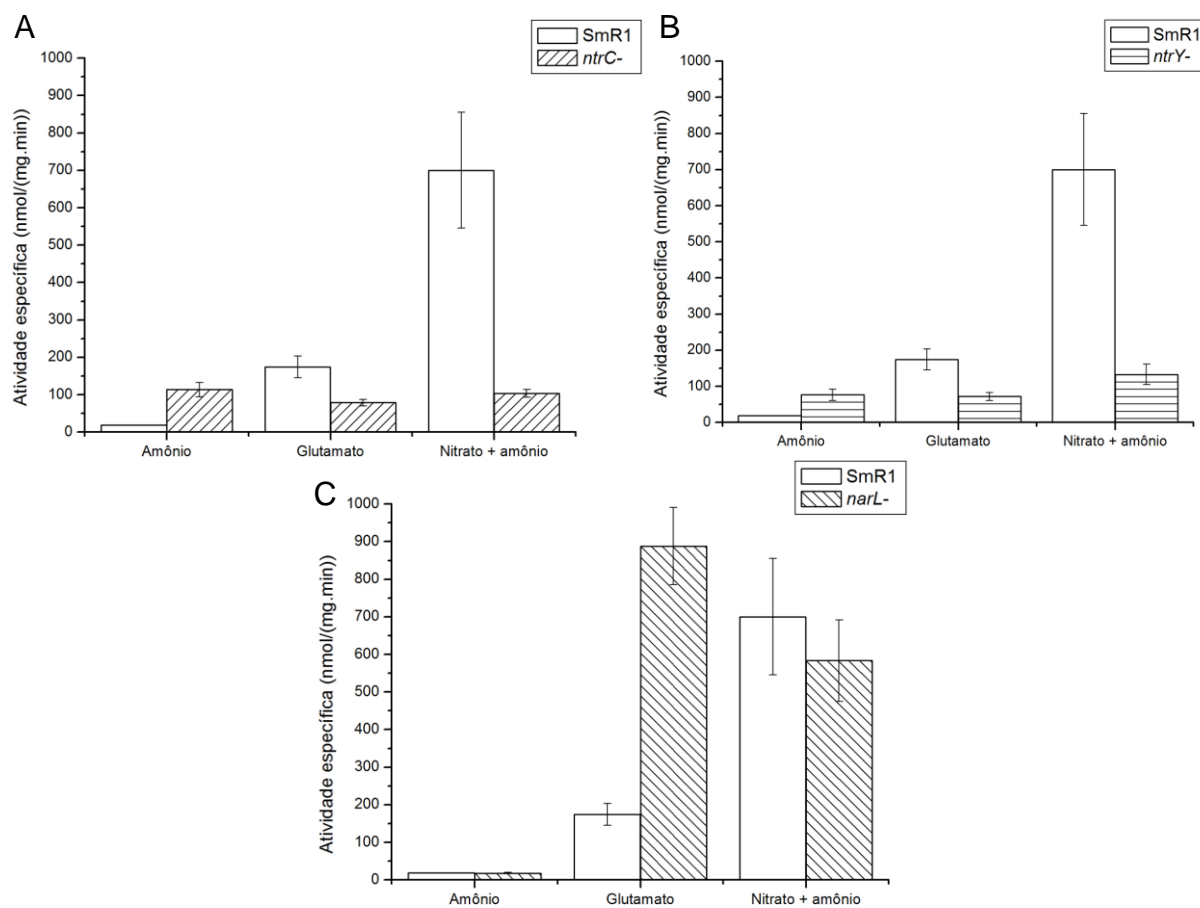


FIGURA 26 – PERFIL DE EXPRESSÃO DO OPERON *nasFED* DE *H. seropedicae* SmR1 EM ESTIRPE SELVAGEM E ESTIRPES MUTANTES

Estirpe SmR1 e estirpes mutantes *ntrC*⁻, *ntrY*⁻ e *narL*⁻ contendo o plasmídeo pMP-*nasFED* foram inoculadas a D.O.₆₀₀ inicial de 0,1 e mantida a 30°C sob agitação durante 6 horas. Foram feitos inóculos em meio NFb-malato em três fontes de nitrogênio diferentes: amônio 20 mM, glutamato 5 mM e nitrato 10 mM + amônio 1 mM. O ensaio foi realizado em condição aeróbica. As figuras mostram comparação de estirpe selvagem com (A) *ntrC*⁻, (B) *ntrY*⁻ e (C) *narL*⁻. A atividade específica foi expressa em nmol de o-nitrofenol produzido por minuto por miligrama de proteína. As barras de erros correspondem ao desvio padrão das médias de quatro experimentos independentes, realizados em triplicata biológica.

Os experimentos realizados neste trabalho permitem concluir que o nitrato é o principal sinal ativador para expressão do operon *nasFED* em *H. seropedicae* e que essa ativação depende de NtrY/NtrX e NtrC e ausência de amônio (FIGURAS 25 e 26). O nível de indução de nitrato em relação a amônio é de quase 38 vezes.

Em *K. pneumoniae*, onde a regulação deste operon é bem entendida, a expressão de *nasF* é induzida por nitrato através da proteína NasR, por um mecanismo de anti-terminação, e também pela proteína NtrC (FIGURA 4). *H. seropedicae* também apresenta um gene *nasR*, com 56% de similaridade do gene *nasR* de *K. pneumoniae*. O produto deste gene em *H. seropedicae* poderia atuar na ativação de expressão de *nasFED*, assim como descrito para *K. pneumoniae*. A

presença de um grampo terminador na região promotora de *nasF* (grampo 2 representado na FIGURA 23) indica que ele pode estar envolvido na ativação de transcrição deste gene. Como ocorre em *K. pneumoniae*, a possível ligação da proteína NasR no grampo 1 (FIGURA 23) poderia impedir a formação do grampo terminador (grampo 2), levando a transcrição dos genes do operon *nasFED* (CHAI; STEWART, 1998; 1999).

As proteínas NtrC e NtrY/NtrX são os principais ativadores de expressão do operon *nasFED* em *H. seropedicae*. Esses dados são consistentes com o que foi observado em *K. pneumoniae*. Neste organismo, a expressão do operon *nasFED* é induzida de forma direta pela proteína NtrC, via fator σ^{54} (LIN; STEWART, 1996). Como foram encontrados possíveis sítios de ligação para NtrC e fator σ^{54} na região promotora de *nasF* de *H. seropedicae*, é possível que o efeito de NtrC na ativação desta região promotora também seja direto (FIGURA 22). Por outro lado, *K. pneumoniae* não apresenta genes que codificam para as proteínas NtrY e NtrX. O efeito ativador de NtrX e NtrY sobre a região do operon *nasFED* nunca tinha sido mostrado em outros organismos.

Em limitação de nitrogênio (glutamato 5 mM) também houve indução de expressão do operon *nasFED* de *H. seropedicae*, mas em menor escala quando comparado com a condição contendo nitrato (FIGURAS 25 e 26). De forma semelhante, em *K. pneumoniae*, *nasF* também apresenta leve indução por baixa concentração de nitrogênio. Neste organismo, foi proposto que essa indução pode ser mediada por NasR, já que o gene que codifica para esta proteína, *nasR*, está sob controle do Sistema Ntr (que está ativo em baixo nitrogênio) (LIN; STEWART, 1996; WU *et al.*, 1999). Em *H. seropedicae*, na região à montante de *nasR*, provável região regulatória deste gene, são encontrados possíveis sítios de ligação para NtrC e σ^{54} . Este é um indício que neste organismo, assim como ocorre em *K. pneumoniae*, *nasR* é regulado pelo sistema Ntr.

A proteína NarL não afetou a expressão de *nasFED* de *H. seropedicae* na presença de nitrato (FIGURA 26), o que é consistente com dados para *K. pneumoniae*. Neste organismo, foi demonstrado que NarL não é importante para a atividade da nitrato redutase assimilatória o que sugere que esta proteína não regula genes envolvidos com a assimilação de nitrato, como exemplo, *nasFED* (STEWART, 1982).

4.3 ANÁLISE FUNCIONAL DE NarG E NasA ATRAVÉS DE MUTAGÊNESE

No genoma de *H. seropedicae* são encontrados genes que codificam para duas prováveis nitrato redutases: a nitrato redutase assimilatória (genes *nasA* e *Hsero_2899*) e a nitrato redutase respiratória (genes *narGHI*) (PEDROSA *et al.*, 2011). Em condições normais de aeração, este organismo é capaz de crescer em meio contendo nitrato como única fonte de nitrogênio. Desse modo, é provável que o nitrato seja assimilado por *H. seropedicae* através da nitrato redutase assimilatória. O nitrito gerado por esta enzima provavelmente é convertido a amônio através da provável nitrito redutase codificada pelos genes *nirBD*.

Por outro lado, na ausência de oxigênio *H. seropedicae* não é capaz de crescer na presença de nitrato como única fonte de nitrogênio (BALDANI *et al.*, 1986). Com isso, é intrigante que esta bactéria apresente genes cujos produtos estão envolvidos com a utilização de nitrato como aceptor final de elétrons (genes *narGHI*). Além disso, em meio semi-sólido contendo nitrato não foi possível detectar quantidades significativas de N_2O , o que sugere que este organismo não é capaz de denitrificar nitrato em anaerobiose (BALDANI *et al.*, 1986). Esta observação é coerente com a ausência no genoma de *H. seropedicae* de genes que codificam para nitrito redutase dissimilatória, óxido nítrico redutase e óxido nitroso redutase, enzimas que estão relacionadas com a denitrificação de nitrato.

Com base nisso, um dos objetivos deste estudo foi investigar o papel das duas prováveis nitrato redutases de *H. seropedicae*. Para isso, os genes *nasA* e *narG*, que codificam para as subunidades catalíticas da nitrato redutase assimilatória e nitrato redutase respiratória, respectivamente, foram deletados. Foram construídos mutantes simples (*nasA*⁻ e *narG*⁻) e mutante duplo (*narGnasA*⁻). O fenótipo dos três mutantes foi avaliado quanto a capacidade de crescer em amônio e nitrato em aerobiose e microaerobiose e quanto a capacidade de produzir nitrito.

4.3.1 Construção e confirmação dos mutantes *narG*⁻, *nasA*⁻ e *narGnasA*⁻

Para construção dos mutantes simples *narG*⁻ e *nasA*⁻, foram deletados 3651 pb e 2715 pb destes genes, respectivamente, conforme estratégia descrita na seção 3.12. Primeiramente, foram construídos os plasmídeos pSUP-*narG-sacB* e pSUP-*nasA-sacB*. A identidade deles foi confirmada através de digestão destes com as

enzimas de restrição *Bam*HI e *Sal*I (FIGURA 27). Os fragmentos liberados correspondem ao vetor pSUP202 (cerca de 7,7 Kb), ao fragmento *sacB-Km* (cerca de 5 Kb) e às regiões UP-DOWN de *narG* (1,1 Kb) (FIGURA 27A) ou *nasA* (1,2 Kb) (FIGURA 27B). Em seguida, estes dois plasmídeos construídos foram transferidos por conjugação para *H. seropedicae* e as colônias que sofreram os dois eventos de recombinação foram selecionadas.

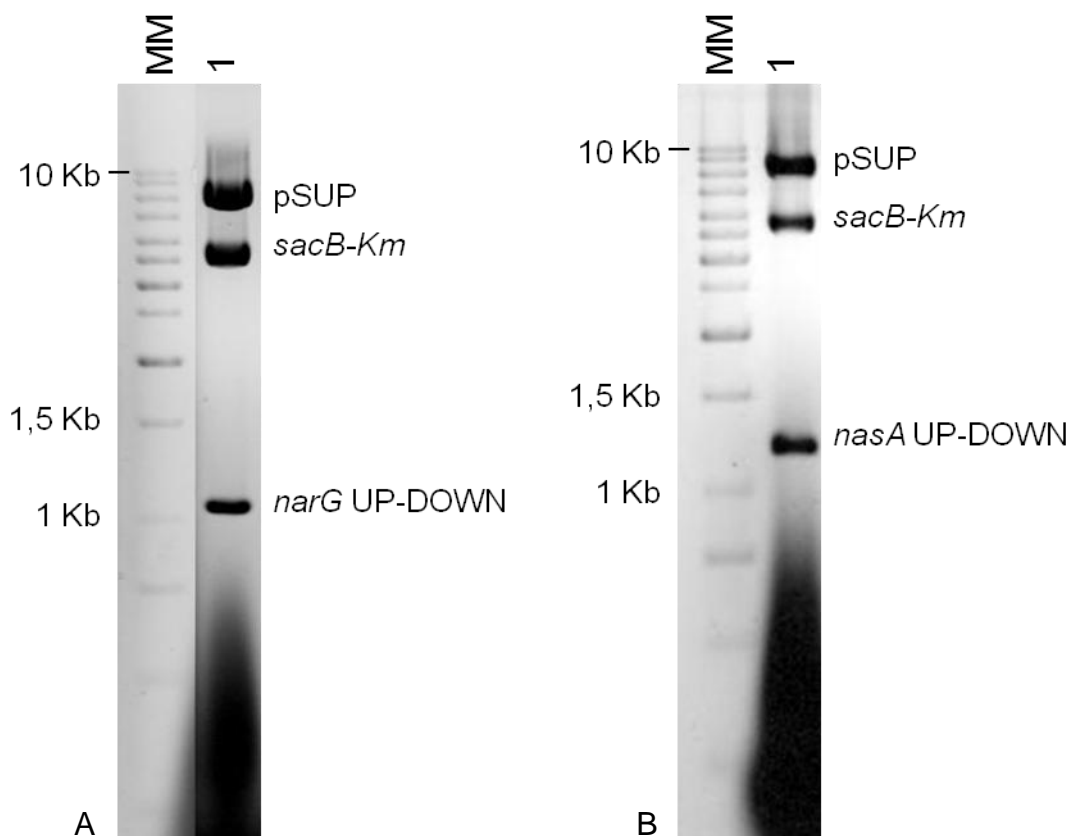


FIGURA 27 – CONFIRMAÇÃO DA CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS pSUP-*narG*-*sacB* E pSUP-*nasA*-*sacB*

Perfil eletroforético em gel de agarose 1% em TAE 1x. A) MM: marcador molecular (Fermentas); linha 1: plasmídeo pSUP-*narG*-*sacB* digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Sal*I. B) MM: marcador molecular (Fermentas); linha 1: plasmídeo pSUP-*nasA*-*sacB* digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Sal*I.

A confirmação do mutante *narG*⁻ foi realizada através de PCR. Primeiramente foi realizada uma PCR com os *primers* NARG UP FOR e NARG DOWN REV para confirmar que esse mutante contém a “cópia deletada”, correspondente aos fragmentos UP-DOWN ligados (FIGURA 28A). Apenas na PCR realizada com o mutante *narG*⁻ houve amplificação de uma banda com cerca de 1,1 Kb que corresponde à “cópia deletada”. Como o gene *narG* é muito grande (3,7 Kb)

não foi possível visualizar a amplificação da banda correspondente à “cópia selvagem” na estirpe selvagem. Em função disso, uma segunda PCR foi realizada com um dos *primers* anelando dentro da região que deveria estar deletada. A banda correspondente a este fragmento foi amplificada apenas na PCR realizada com a estirpe selvagem, o que confirma que a estirpe *narG*⁻ não possui uma cópia intacta do gene *narG* (FIGURA 28B).

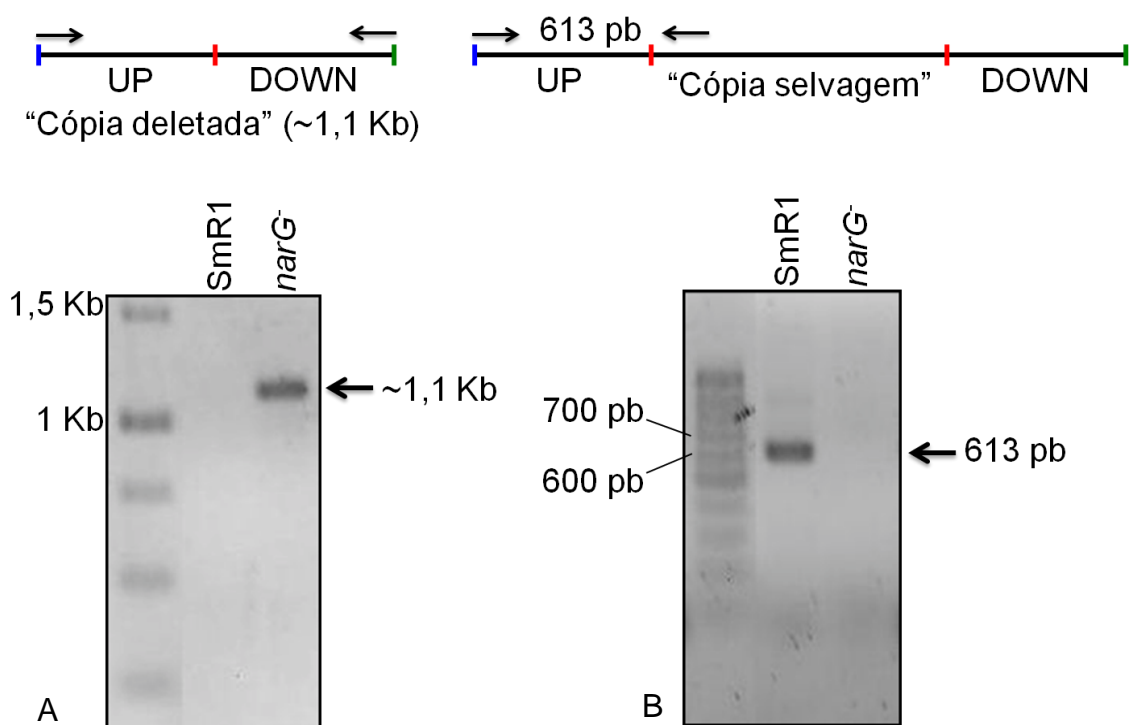


FIGURA 28 – CONFIRMAÇÃO DO MUTANTE *narG*⁻

Perfil eletroforético em gel de agarose 1% em TAE 1x. A) PCR realizada com os primers NARG UP FOR e NARG DOWN REV. SmR1: estirpe selvagem, *narG*⁻: mutante *narG*⁻. O fragmento amplificado de aproximadamente 1,1 Kb corresponde à “cópia deletada”, que está indicada no esquema acima do gel. B) PCR realizada com os primers NARG UP FOR e NARG REV. SmR1: estirpe selvagem, *narG*⁻: mutante *narG*⁻. O fragmento amplificado de 613 pares de base corresponde à região indicada no esquema localizado acima do gel.

O mutante *nasA*⁻ também foi confirmado da mesma forma que o mutante *narG*⁻. A figura 29A mostra que o mutante apresenta a “cópia deletada” do gene, enquanto que a figura 29B mostra que não há uma cópia intacta de *nasA* no mutante. Assim como *narG*, o gene *nasA* é muito grande (2,7Kb) e, desse modo, não foi possível visualizar a amplificação de banda correspondente à “cópia selvagem” na PCR realizada a estirpe selvagem.

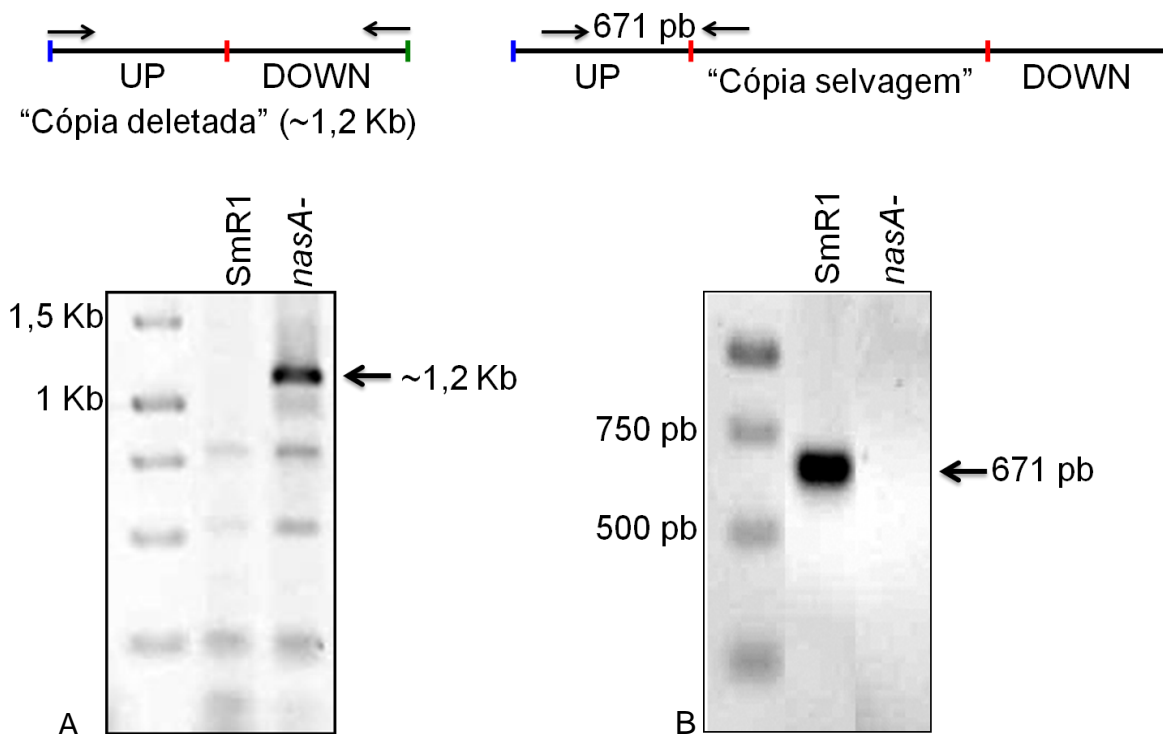


FIGURA 29 – CONFIRMAÇÃO DO MUTANTE *nasA*⁻

Perfil eletroforético em gel de agarose 1% em TAE 1x. A) PCR realizada com os primers NASA UP FOR e NASA DOWN REV. SmR1: estirpe selvagem, *nasA*⁻: mutante *nasA*⁻. O fragmento amplificado de aproximadamente 1,2 Kb corresponde à “cópia deletada” que está indicada no esquema acima do gel. B) PCR realizada com os primers NASA REV e NasA reverse (RT). SmR1: estirpe selvagem, *nasA*⁻: mutante *nasA*⁻. O fragmento amplificado de 671 pares de base corresponde à região indicada no esquema localizado acima do gel.

O duplo mutante foi construído a partir do mutante *narG*⁻, no qual foi introduzido o plasmídeo pSUP-*nasA-sacB*. Na figura 30A e 30C estão indicadas a confirmação da deleção do gene *narG*, enquanto que na figura 30B e 30D, a confirmação de que o gene *nasA* foi realmente deletado.

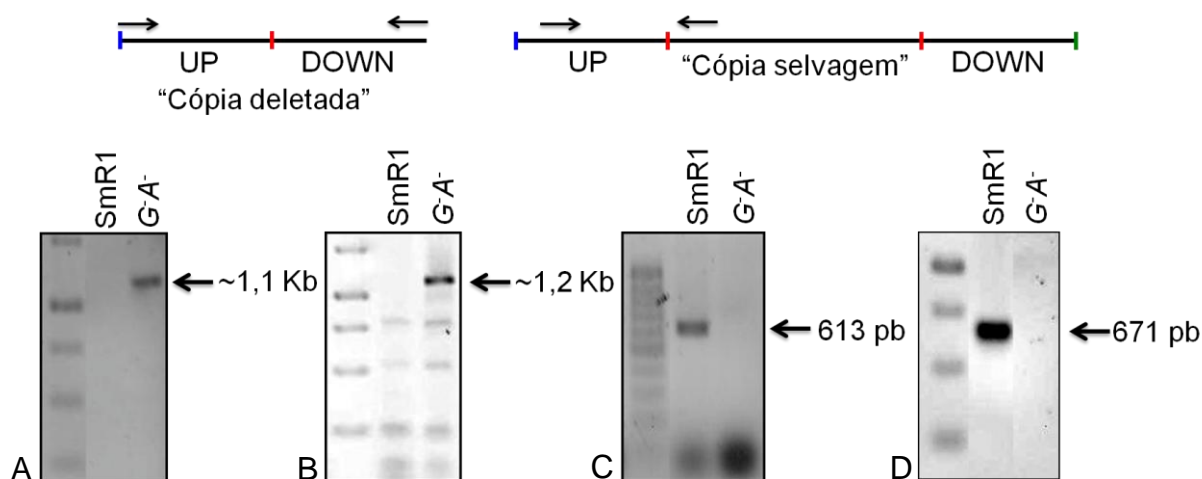


FIGURA 30 – CONFIRMAÇÃO DO DUPLO MUTANTE *narGnasA*⁻

Perfil eletroforético em gel de agarose 1% em TAE 1x. A) PCR realizada com os primers NARG UP FOR e NARG DOWN REV. SmR1: estirpe selvagem, *narGnasA*⁻: duplo mutante. O fragmento amplificado de aproximadamente 1,1 Kb corresponde à “cópia deletada”. B) PCR realizada com os primers NASA UP FOR e NASA DOWN REV. SmR1: estirpe selvagem, *narGnasA*⁻: duplo mutante. O fragmento amplificado de aproximadamente 1,2 Kb corresponde à “cópia deletada”. C) PCR realizada com os primers NARG UP FOR e NARG REV. SmR1: estirpe selvagem, *narGnasA*⁻: duplo mutante. O fragmento amplificado de 613 pares de base corresponde à região indicada no esquema localizado acima do gel. D) PCR realizada com os primers NASA REV e NasA reverse (RT). SmR1: estirpe selvagem, *narGnasA*⁻: duplo mutante. O fragmento amplificado de 671 pares de base corresponde à região indicada no esquema localizado acima do gel.

4.3.2 Perfil de crescimento dos mutantes *narG*⁻, *nasA*⁻ e *narGnasA*⁻

Após confirmação da identidade das estirpes mutantes, o fenótipo delas foi avaliado e comparado com a estirpe selvagem quanto à capacidade de crescimento em diferentes fontes de nitrogênio (amônio e nitrato), diferentes formas de aeração (aerobiose e microaerobiose) e quanto à capacidade de produzir nitrito. Para isso, primeiramente foram realizadas curvas de crescimento com as três estirpes mutantes e a selvagem em condição de aeração normal (aerobiose). A capacidade de crescimento destas estirpes em amônio e nitrato como únicas fontes de nitrogênio foi avaliada através da determinação da DO₆₀₀. A produção de nitrito foi avaliada apenas na condição com nitrato.

Em seguida, o perfil de crescimento das estirpes em amônio e nitrato foi avaliado em condições de baixa aeração (microaerobiose). O crescimento das culturas foi acompanhado através de DO₆₀₀, dosagem de proteínas e viabilidade de células. A produção de nitrito foi avaliada tanto na condição com amônio, como com nitrato.

Nas figuras 31A e 31B estão representadas as curvas de crescimento em aerobiose utilizando amônio ou nitrato, como únicas fontes de nitrogênio, respectivamente. Em amônio e aerobiose não houve diferença significativa entre o perfil de crescimento de estirpes mutantes e estirpe selvagem (FIGURA 31A). Entretanto, em meio contendo nitrato como fonte única de nitrogênio o mutante *narG*⁻ apresentou crescimento um pouco mais lento em relação a estirpe selvagem, mas ao longo das 24 horas ambas as estirpes atingiram DO₆₀₀ muito próximas (FIGURA 31B). Neste último caso, provavelmente a nitrato redutase assimilatória está assimilando o nitrato, permitindo o crescimento do mutante *narG*⁻. O atraso no crescimento desta última estirpe sugere que a nitrato redutase respiratória pode ter função complementar na assimilação de nitrato. Por outro lado, o mutante *nasA*⁻ não foi capaz de crescer em nitrato como única fonte de nitrogênio. Neste caso, a nitrato redutase respiratória não foi capaz de substituir a nitrato redutase assimilatória. O duplo mutante, como esperado, não foi capaz de crescer em nitrato. Estes resultados mostram que a nitrato redutase assimilatória é essencial para o consumo de nitrato de *H. seropedicae*.

Na condição de aerobiose e nitrato, a produção de nitrito pela estirpe selvagem e pelo mutante *narG*⁻ também foi avaliada, mas não foram encontradas diferenças importantes entre as duas estirpes. A baixa concentração de nitrito detectada nessas duas estirpes deve ser decorrente de sua rápida conversão em amônio, catalisado pela nitrito redutase, e incorporação em biomoléculas, permitindo seu crescimento. Na condição com amônio e nos mutantes *nasA*⁻ e *narGnasA*⁻ o nitrito não foi quantificado, pois nestas condições o nitrito está presente apenas em concentrações muito pequenas.

Após avaliar o efeito da oxigenação sobre o crescimento das estirpes mutantes *narG*⁻, *nasA*⁻ e *narGnasA*⁻, o crescimento destas e a produção de nitrito foram avaliados em condições de microaerobiose (segundo item 3.13 de Material e Métodos).

Conforme esperado, em meio contendo amônio como única fonte de nitrogênio, nenhuma das estirpes avaliadas apresentou produção significativa de nitrito (FIGURA 33A). Por outro lado, as estirpes *nasA*⁻ e *narGnasA*⁻ apresentaram crescimento ligeiramente maior que as estirpes selvagem e *narG*⁻. Com o intuito de averiguar se essas diferenças foram resultado de diferenças na coloração de células, neste mesmo experimento foram retiradas alíquotas para dosagem de

proteínas. Entretanto, como observado na figura 33A, o perfil de concentração de proteínas e de DO₆₀₀ é bastante semelhante. Além disso, a viabilidade das células também foi avaliada através de contagem de colônias em placa (conforme item 1.15 de Material e Métodos) (FIGURA 34A). Novamente, o mesmo perfil observado anteriormente foi visualizado: as estirpes *nasA*⁻ e *narGnasA*⁻ apresentam crescimento maior em relação às estirpes selvagem e *narG*⁻. Além disso, esta figura mostra que o número de células presentes no tempo 0h das estirpes *nasA*⁻ e *narGnasA*⁻ é maior em relação às duas outras estirpes. O tempo de geração das quatro estirpes em amônio e microaerobiose é muito semelhante (cerca de seis horas).

Por outro lado, em experimentos anteriores, realizados nas mesmas condições do que os descritos na figura 32A (dados não mostrados) foi observado que as três estirpes mutantes apresentaram crescimento maior que a estirpe selvagem.

Juntos, os resultados mostrados acima indicam que o crescimento maior das estirpes *nasA*⁻ e *narGnasA*⁻ sobre as estirpes selvagem e *narG*⁻ provavelmente é explicado pelo inóculo maior das duas primeiras estirpes em relação às duas últimas. Isso é claramente observado através da figura 34A. Apesar de a DO₆₀₀ dos inóculos correspondentes ao tempo 0h de todas as estirpes ter sido averiguada, ainda foram observadas diferenças nos inóculos iniciais.

O crescimento de estirpe selvagem e estirpes mutantes também foi avaliado em microaerobiose e na presença de nitrato como única fonte de nitrogênio. De forma inesperada, o mutante *narG*⁻ foi capaz de crescer mais que a estirpe selvagem (FIGURA 32B). Até aproximadamente dez horas, o perfil de crescimento das duas estirpes foi semelhante. Entretanto, a partir deste tempo, o mutante *narG*⁻ continuou crescendo, enquanto que a estirpe selvagem parou de crescer. Além disso, a concentração de nitrito variou bastante entre as duas estirpes. Na estirpe selvagem, a concentração de nitrito chega a quase 4 mM em 10 horas, e atinge pico máximo de 8,3 mM no tempo de 24 horas. No mutante *narG*⁻, a concentração máxima de nitrito atingida não passa de 0,5 mM.

Como descrito anteriormente, na condição microaerobiose e nitrato também foi realizada dosagem de proteínas para as quatro estirpes avaliadas (FIGURA 33B). Para o mutante *narG*⁻, foi constatado um aumento na concentração de proteínas ao longo do tempo, o que é coerente o crescimento desta estirpe observado através da

DO₆₀₀. Entretanto, o resultado das dosagens efetuadas com a estirpe selvagem quando em concentração alta de nitrito não são confiáveis, pois quando em contato com Bradford, as amostras apresentaram coloração esverdeada. Os resultados de viabilidade celular mostram que os perfis de crescimento de SmR1 e *narG*⁻ são muito semelhantes (FIGURA 34B).

Como observado anteriormente na condição de aerobiose, em microaerobiose, as estirpes *nasA*⁻ e *narGnasA*⁻ não foram capazes de crescer em nitrato como única fonte de nitrogênio. Esse efeito é constatado tanto por DO₆₀₀, como por dosagem de proteína e por viabilidade celular.

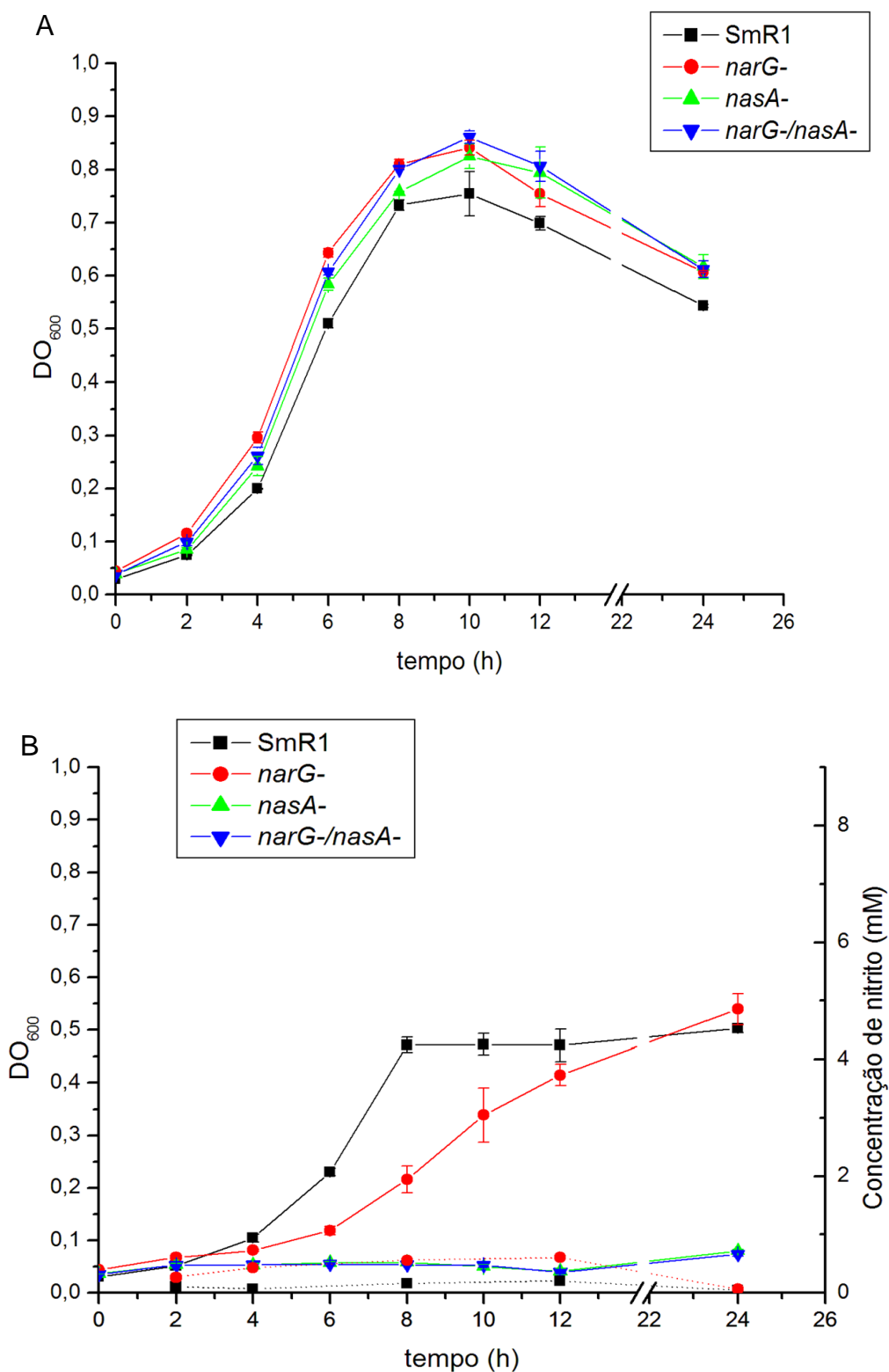


FIGURA 31 – CURVA DE CRESCIMENTO DE ESTIRPE SELVAGEM E ESTIRPES MUTANTES *narG*⁻, *nasA*⁻ e *narGnasA*⁻ EM AEROBIOSE

Estirpes de *H. seropedicae* foram inoculadas a DO₆₀₀ inicial de 0,04 (leitor de microplacas Biotek) e mantidas a 30°C sob agitação, em condição de aeração normal, durante 24 horas. Foram feitos inóculos em meio NFb-malato em (A) amônio 20 mM ou (B) nitrato 10 mM como únicas fontes de nitrogênio. As linhas preenchidas correspondem a DO₆₀₀, enquanto que as linhas pontilhadas correspondem à concentração de nitrito no sobrenadante. As barras de erros correspondem ao desvio padrão da média de dois experimentos.

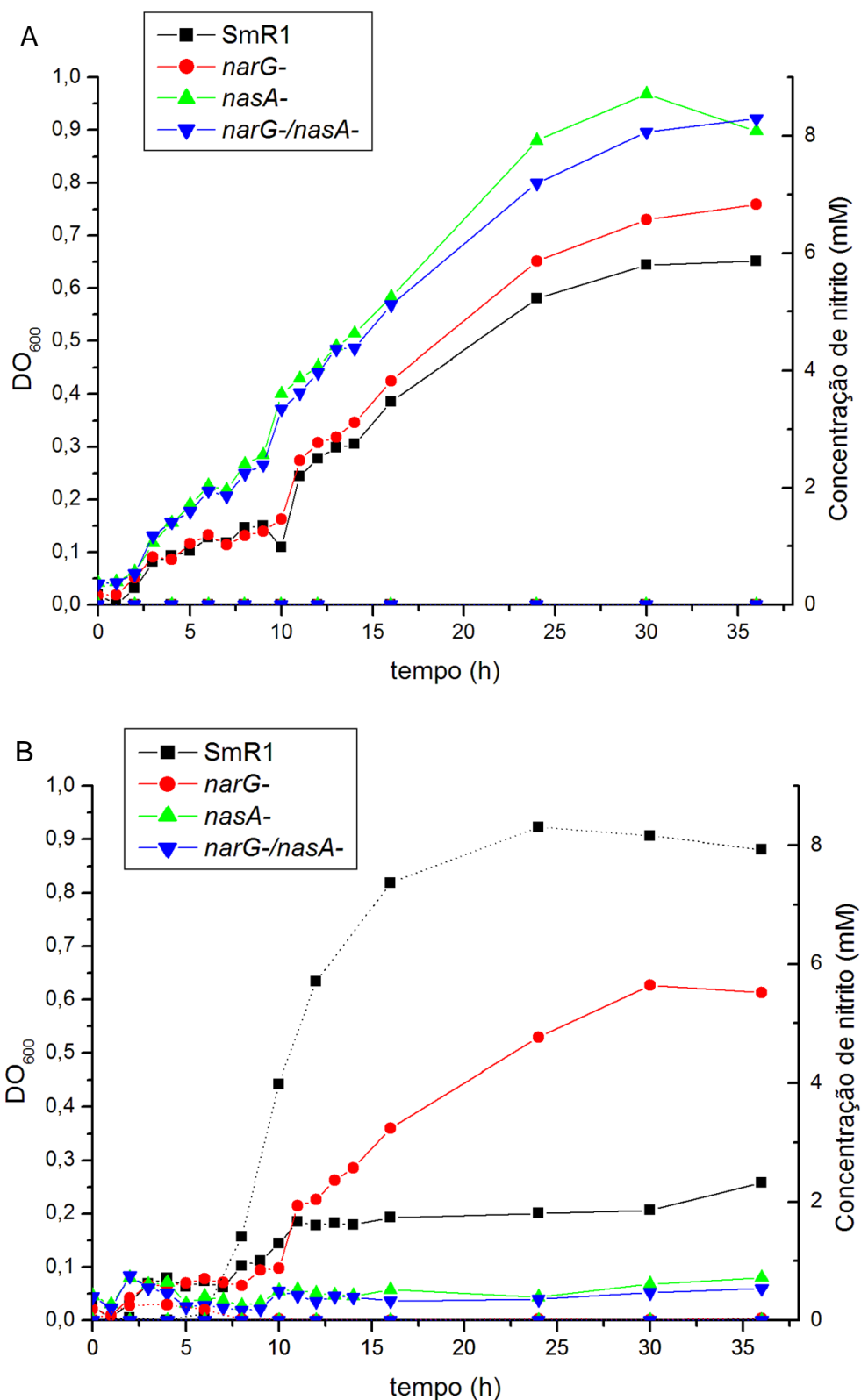


FIGURA 32 – CURVA DE CRESCIMENTO DE ESTIRPE SELVAGEM E ESTIRPES MUTANTES *narG*⁻, *nasA*⁻ E *narGnasA*⁻ EM MICROAEROBIOSE

Estirpes de *H. seropedicae* foram inoculadas a DO₆₀₀ inicial por volta de 0,04 (leitor de microplacas Berthold) e mantidas a 30°C sob agitação, em condições de microaerobiose (item 3.13), durante 36 horas. Foram feitos inóculos em meio NFB-malato em (A) amônio 20 mM ou (B) nitrato 10 mM como únicas fontes de nitrogênio. As linhas preenchidas correspondem a DO₆₀₀, enquanto que as linhas pontilhadas correspondem à concentração de nitrito no sobrenadante.

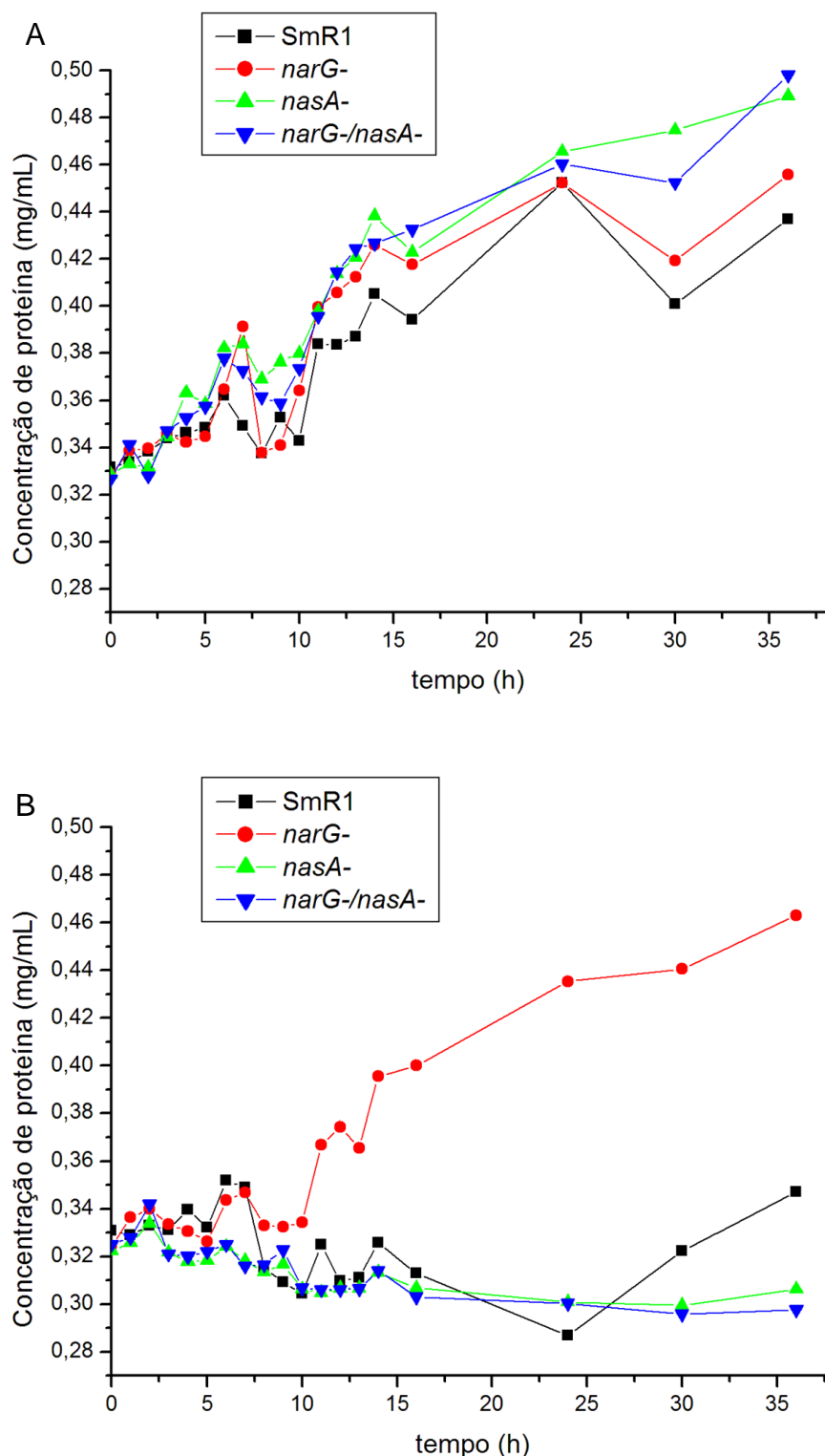


FIGURA 33 – CURVA DE CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA DE ESTIRPE SELVAGEM E ESTIRPES MUTANTES *narG*⁻, *nasA*⁻ E *narGnasA*⁻ EM MICROAEROBIOSE

Estirpes de *H. seropedicae* foram inoculadas a DO₆₀₀ inicial por volta de 0,04 (leitor de microplacas Berthold) e mantidas a 30°C sob agitação em condições de microaerobiose (item 3.13), durante 36 horas. Foram feitos inóculos em meio NFb-malato em (A) amônio 20 mM ou (B) nitrato 10 mM, como únicas fontes de nitrogênio. Nos tempos indicados foram retiradas alíquotas para dosagem de proteínas conforme item 3.11 de Materiais e Métodos.

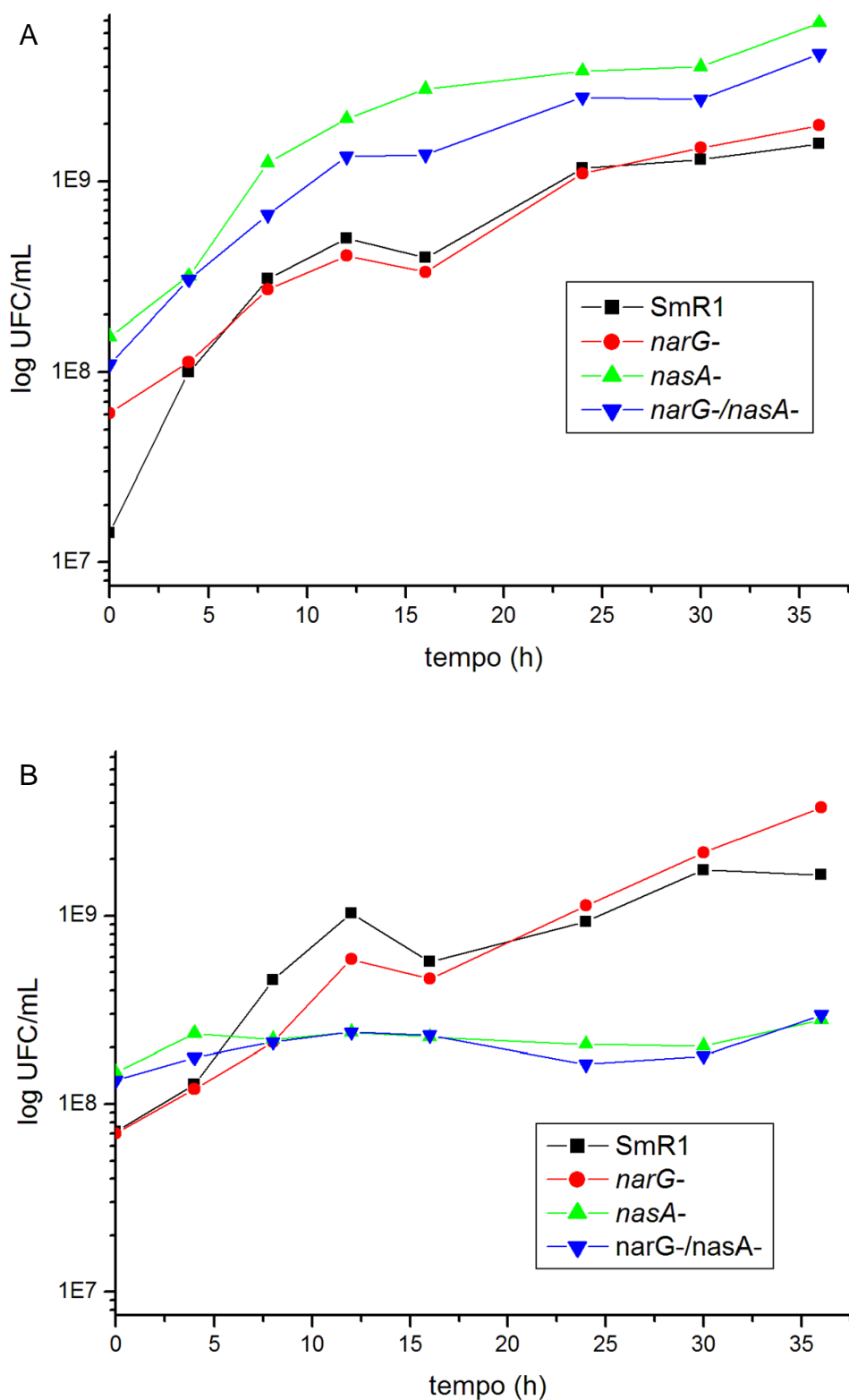


FIGURA 34 – CURVA DE VIABILIDADE DE CÉLULAS DE ESTIRPE SELVAGEM E ESTIRPES MUTANTES *narG*⁻, *nasA*⁻ E *narGnasA*⁻ EM MICROAEROBIOSE

Estirpes de *H. seropedicae* foram inoculadas a DO₆₀₀ inicial por volta de 0,04 (leitor de microplacas Berthold) e mantidas a 30°C sob agitação em condições de microaerobiose (item 3.13), durante 36 horas. Foram feitos inóculos em meio NFB-malato em (A) amônio 20 mM ou (B) nitrato 10 mM. Nos tempos indicados foram retiradas alíquotas para contagem de células conforme item 3.15 de Materiais e Métodos.

Os resultados encontrados neste trabalho mostram que os genes *nasA* e *narG* de *H. seropedicae* são importantes para o metabolismo de nitrato neste organismo e que provavelmente eles codificam as subunidades catalíticas das nitrato redutases assimilatória e respiratória, respectivamente.

O gene *nasA* de *H. seropedicae* é indispensável para o consumo de nitrato, pois o mutante *nasA*⁻ não foi capaz de crescer em aerobiose ou baixos níveis de oxigenação em nitrato como única fonte de nitrogênio. Situação semelhante foi observada em *K. pneumoniae*. Neste organismo, que como *H. seropedicae* apresenta genes que codificam para nitrato redutases assimilatória e respiratória, o mutante *nasA*⁻ também não foi capaz de crescer em nitrato (LIN *et al.*, 1993).

Por outro lado, o gene *narG* pode ser importante para assimilação de nitrato em *H. seropedicae*, pois apesar de o mutante *narG*⁻ ter sido capaz de crescer em nitrato e em aerobiose, esse crescimento foi mais lento. Já foi reportada função de assimilação de nitrato para a nitrato redutase respiratória em *Mycobacterium tuberculosis*. Entretanto neste microrganismo, o mutante *narG*⁻ não foi capaz de crescer em nitrato como única fonte de nitrogênio (MALM *et al.*, 2009).

Em nitrato e microaerobiose, é observado um aumento na concentração de nitrito no meio ao longo do tempo na estirpe selvagem, o que não ocorre no mutante *narG*⁻. Isso sugere que o produto do gene *narG* está relacionado com alta produção de nitrito, o que tem um efeito tóxico para a célula, já que a estirpe selvagem não é mais capaz de crescer em nitrato, quando os níveis de nitrito no sobrenadante estão maiores que 4 mM (FIGURA 32B). É possível que nesta condição os genes *nirBD* não sejam expressos ou sejam expressos em níveis muito baixos. Guimarães (2011) mostrou por PCR em tempo real que o gene *nirD* é reprimido em cerca de 40 vezes em DO₆₀₀ 1,0, condição com baixa aeração da cultura, em relação a DO₆₀₀ 0,5. Desse modo, a quantidade da nitrato redutase NirBD presente na célula pode não ser suficiente para metabolizar todo o nitrito produzido por NarGHI. Como consequência, há excesso de produção de nitrito, o qual é exportado para o meio e é tóxico para a célula.

Apesar de a estirpe *narG*⁻ apresentar crescimento maior que a selvagem em nitrato e microaerobiose (FIGURA 32B), ambas as estirpes apresentam viabilidade celular semelhantes entre si (FIGURA 34B). Isso sugere que o mutante *narG*⁻ é menos viável que SmR1.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A nitrato redutase assimilatória de *H. seropedicae* é essencial para o consumo de nitrato neste organismo, pois o mutante *nasA*⁻ não foi capaz de crescer em meio contendo nitrato como única fonte de nitrogênio (FIGURAS 31B E 32B). Em trabalhos anteriores foi mostrado que os mutantes *ntrC*⁻, *ntrY* e *narL*⁻ não são capazes de crescer em nitrato como única fonte de nitrogênio (PERSUHN *et al.*, 2000; ALVES, 2004; OLIVEIRA, 2008). Além disso, as proteínas mutadas nestes três últimos mutantes (NtrC, NtrY e NarL) são indispensáveis para a expressão do operon *narKnirBDHsero_2899nasA*, que contém vários genes que codificam para a nitrato redutase assimilatória (*Hsero_2899* e *nasA*) e provável nitrito redutase (*nirBD*) (ALVES, 2006; MIGUEL, 2011). Desse modo, provavelmente a ausência de crescimento em nitrato apenas, verificada para os mutantes *ntrC*, *ntrY* e *narL* é resultado do requerimento das proteínas NtrC, NtrY/NtrX e NarL para ativação do operon que contém os genes que codificam para a nitrato redutase assimilatória. Além disso, as proteínas NtrC e NtrY/NtrX também são requeridas para a ativação de expressão dos genes contidos no operon *nasFED*, que codificam para transportadores de nitrato do tipo ABC (FIGURAS 26A e 26B). Dentre todos os genes envolvidos com assimilação de nitrato em *H. seropedicae*, apenas a regulação do gene *nasR* não é conhecida (FIGURA 35).

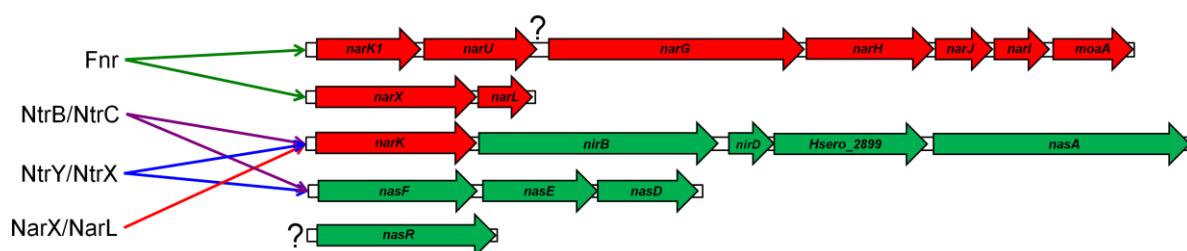


FIGURA 35 – REGULAÇÃO DOS GENES ENVOLVIDOS COM METABOLISMO DE NITRATO EM *H. seropedicae*

Os pontos de interrogação referem-se a regiões promotoras cuja regulação ainda não foi estudada.

Em relação à regulação dos genes envolvidos com a nitrato redutase respiratória, neste trabalho foi mostrado que os prováveis operons *narK₁UGHJImoaA* e *narXL* são ativados em resposta a baixos níveis de oxigênio, através da proteína Fnr (FIGURAS 16A e 21A). Entretanto, a regulação do provável promotor à montante do gene *narG* ainda não é conhecida (FIGURA 35).

Essa forte regulação por oxigênio observada nos promotores à montante de *narX* e *narK₁*, em conjunto com a forte indução de transcrição dos genes do provável operon *narK₁UGHJImoaA* que foi observada no transcriptoma (FIGURA 12 e TABELA 5), são um indício de que *H. seropedicae* é capaz de utilizar nitrato como aceptor final de elétrons. Entretanto, este microrganismo não é capaz de crescer em anaerobiose utilizando nitrato como única fonte de nitrogênio. Situação semelhante foi observada para a bactéria gram-positiva *Corynebacterium glutamicum*, a qual apesar de conter os genes *narGHI*, acreditava-se que não era capaz de utilizar nitrato como aceptor final na cadeia de elétrons (BOTT; NIEBISCH, 2003). Entretanto, foi demonstrado que esta bactéria é capaz de respirar nitrato, mas pela ausência de uma nitrito redutase, todo o nitrito produzido é exportado para fora da célula (NISHIMURA *et al.*, 2007). Desse modo, *C. glutamicum* é capaz de crescer em anaerobiose utilizando nitrato como aceptor final na cadeia de elétrons, mas em meio suplementado com outra fonte de nitrogênio, que é utilizada para crescimento.

H. seropedicae apresenta os genes *nirBD*, que codificam para uma possível nitrito redutase. Em *E. coli*, esta enzima é expressa em baixa concentração de oxigênio e está relacionada com a detoxificação de nitrito acumulado a partir da respiração de nitrato (MORENO-VIVIÁN *et al.*, 1999). Entretanto, como discutido na seção 4.3.3, como há acúmulo de nitrito na estirpe selvagem crescida em nitrato e microaerobiose, é possível que nestas condições os genes da nitrito redutase (*nirBD*) de *H. seropedicae* estejam com transcrição reprimida ou não sejam expressos. Com base nisso, o nitrito que seria produzido pelo complexo enzimático NarGHI em condições de baixa aeração não seria convertido a amônio através de NirBD e a bactéria não cresceria por ausência de fonte de nitrogênio para crescimento. Com isso, de forma semelhante a *C. glutamicum*, é possível que *H. seropedicae* seja capaz de respirar nitrato, mas não de assimilar este composto em baixa concentração de oxigênio.

A figura 36 mostra um resumo do papel proposto para as nitrato redutases, nitrito redutase e produto do gene *Hsero_2508* no metabolismo de nitrato em *H. seropedicae*. A nitrato redutase assimilatória NasAHsero_2899 é a principal forma de *H. seropedicae* assimilar nitrato. Apesar de a nitrato redutase respiratória NarGHI também poder apresentar capacidade de assimilação de nitrato, sua principal função em *H. seropedicae* ainda não é conhecida. O nitrito gerado pode então ser convertido a amônio pela nitrito redutase, e então ser incorporado em biomoléculas,

ou ainda ser convertido a óxido nítrico por NarGHI, como proposto na seção 4.1.3. O óxido nítrico gerado seria poderia ser utilizado como substrato pelo produto do gene Hsero_2508, e como observado em *E. coli*, convertido a nitrato em aerobiose e a óxido nitroso em baixos níveis de oxigênio (POOLE; HUGHES, 2000).

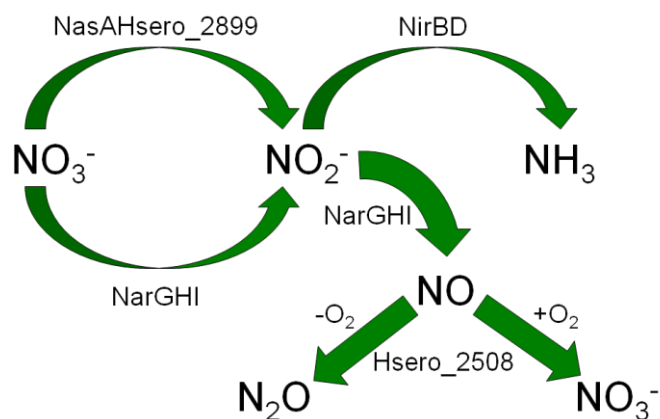


FIGURA 36 – MODELO PROPOSTO PARA O PAPEL DAS NITRATO REDUTASES, NITRITO REDUTASE E PRODUTO DO GENE *Hsero_2508* NO METABOLISMO DE NITRATO DE *H. seropedicae*

6 CONCLUSÕES

- Através do transcriptoma realizado de *H. seropedicae* crescido em nitrato, foi observado que os genes do provável operon *narK₁UGHJImoaA*, o qual contém genes que codificam a nitrato redutase respiratória, estão entre os genes mais induzidos na presença de nitrato. Os genes que codificam a nitrato redutase assimilatória também se encontram induzidos (*Hsero_2899* e *nasA*).
- Os ensaios de β -galactosidase mostraram que a expressão do operon *narXL* é induzida em baixo oxigênio, via proteína Fnr. Além disso, a expressão do operon *narK₁UGHJImoaA* é induzida por nitrato, e também por baixo oxigênio, via proteína Fnr. Por outro lado, a expressão do operon *nasFED* é induzida por nitrato e em condição limitante de nitrogênio, via proteínas membros do sistema de dois componentes NtrB/NtrC e NtrY/NtrX.
- Os ensaios realizados com o mutante *nasA⁻* mostraram que a nitrato redutase assimilatória NasAHsero_2899 é indispensável para a assimilação de nitrato em *H. seropedicae*. Por outro lado, experimentos realizados com o mutante *narG⁻* mostraram que a nitrato redutase respiratória NarGHI pode ser capaz de assimilar nitrato de forma secundária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, L. R. **Caracterização dos genes *ntrY* e *ntrX* de *Herbaspirillum seropedicae***. 2004. 50 f Monografia (Ciências Biológicas) Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- ALVES, L. R. **Análise funcional dos genes *ntrY* e *ntrX* de *Herbaspirillum seropedicae***. 2006. 83 f Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- BAGGERLY, K. A. *et al.* Differential expression in SAGE: accounting for normal between-library variation. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1477-1483, Aug 2003.
- BALDANI, J. I. *et al.* A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 56, n. 3, p. 365, 1984.
- BALDANI, J. I. *et al.* Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 86-93, Jan 1986.
- BARRIOS, H.; VALDERRAMA, B.; MORETT, E. Compilation and analysis of σ^{54} -dependent promoter sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 22, p. 4305-13, Nov 1999.
- BATISTA, M. B. **Construção e caracterização de estirpes mutantes de *Herbaspirillum seropedicae* nos genes *fnr1*, *fnr2* e *fnr3***. 2011. 118 f Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- BERTERO, M. G. *et al.* Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A. **Nature Structural Biology**, v. 10, n. 9, p. 681-687, Sep 2003.
- BLASCO, F. *et al.* NarJ is a specific chaperone required for molybdenum cofactor assembly in nitrate reductase A of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 435-447, May 1998.
- BLASCO, F. *et al.* The coordination and function of the redox centres of the membrane-bound nitrate reductases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 2, p. 179-193, Feb 2001.
- BONATO, P. **Identificação do sítio de ligação ao DNA da proteína NtrX de *Herbaspirillum seropedicae***. 2009. 47 f Monografia (Ciências Biológicas) Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná
- BONNEFOY, V.; DEMOSS, J. A. Nitrate reductases in *Escherichia coli*. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 66, n. 1-3, p. 47-56, 1994

BOTT, M.; NIEBISCH, A. The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. **Journal of Biotechnology**, v. 104, n. 1-3, p. 129-53, Sep 2003.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CANFIELD, D. E.; GLAZER, A. N.; FALKOWSKI, P. G. The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. **Science**, v. 330, n. 6001, p. 192-196, Oct 8 2010.

CHAI, W.; STEWART, V. RNA sequence requirements for NasR-mediated, nitrate-responsive transcription antitermination of the *Klebsiella oxytoca* M5al *nasF* operon leader. **Journal of Molecular Biology**, v. 292, n. 2, p. 203-16, Sep 1999.

CHAI, W. H.; STEWART, V. NasR, a novel RNA-binding protein, mediates nitrate-responsive transcription antitermination of the *Klebsiella oxytoca* M5al *nasF* operon leader in vitro. **Journal of Molecular Biology**, v. 283, n. 2, p. 339-351, Oct 1998.

CHUBATSU, L. *et al.* Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant Soil**, 2011.

CRAWFORD, N. M.; GLASS, A. D. M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. **Trends in Plant Science**, v. 3, n. 10, p. 389-395, Oct 1998.

DARWIN, A. J.; LI, J.; STEWART, V. Analysis of nitrate regulatory protein NarL-binding sites in the *fdnG* and *narG* operon control regions of *Escherichia coli* K-12. **Molecular Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 621-32, May 1996.

DARWIN, A. J.; STEWART, V. Expression of the *narX*, *narL*, *narP*, and *narQ* genes of *Escherichia coli* K-12: Regulation of the regulators. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 13, p. 3865-3869, Jul 1995.

DARWIN, A. J. *et al.* Differential regulation by the homologous response regulators NarL and NarP of *Escherichia coli* K-12 depends on DNA binding site arrangement. **Molecular Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 583-595, Aug 1997.

DAVIDSON, A. L.; CHEN, J. ATP-binding cassette transporters in bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, p. 241-268, 2004

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621-631, Aug 2004.

DONG, X.; LI, S.; DEMOSS, J. Upstream sequence elements required for NarL-mediated activation of transcription from the *narGHJ* promoter of *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 20, p. 14122-14128, Jul 1992

FALK, E. C. *et al.* Deoxyribonucleic and ribonucleic-acid homology studies of the genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 80-85, Jan 1986.

FERRO-LUZZI AMES, G.; NIKAIDO, K. Nitrogen regulation in *Salmonella typhimurium*. Identification of an NtrC protein-binding site and definition of a consensus binding sequence. **EMBO Journal**, v. 4, n. 2, p. 539-47, Feb 1985.

FLORES, E. *et al.* Photosynthetic nitrate assimilation in cyanobacteria. **Photosynthesis Research**, v. 83, n. 2, p. 117-133, Jan 2005.

GOLDMAN, B. S.; LIN, J. T.; STEWART, V. Identification and structure of the *nasR* gene encoding a nitrate-responsive and nitrite-responsive positive regulator of *nasFEDCBA* (nitrate assimilation) operon expression in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 16, p. 5077-5085, Aug 1994.

GRUBER, A. R. *et al.* The Vienna RNA Websuite. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p.70-74, Jul 2008.

GRUBER, N.; GALLOWAY, J. N. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. **Nature**, v. 451, n. 7176, p. 293-296, Jan 2008.

GUIMARÃES, L. F. S. **Análise da expressão dos genes do metabolismo de nitrato nas estirpes SmR1 e DCP286A de *Herbaspirillum seropedicae* por PCR em tempo real**. 2011. 77 Dissertação de mestrado Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

HAMILTON, T. L. *et al.* Transcriptional Profiling of Nitrogen Fixation in *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 17, p. 4477-4486, Sep 2011.

HAWLEY, D. K.; MCCLURE, W. R. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 11, n. 8, p. 2237-55, Apr 1983.

HERVÁS, A. B.; CANOSA, I.; SANTERO, E. Transcriptome Analysis of *Pseudomonas putida* in Response to Nitrogen Availability, **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 1, Jan 2008.

HYNES, M. F. *et al.* Direct selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposons carrying the *Bacillus subtilis* *sacB* gene. **Gene**, v. 78, n. 1, p. 111-120, May 1989.

IOBBI, C. *et al.* Biochemical and immunological evidence for a second nitrate reductase in *Escherichia coli* K-12. **European Journal of Biochemistry**, v. 168, n. 2, p. 451-459, Oct 1987.

ISABELLA, V. M.; CLARK, V. L. Deep sequencing-based analysis of the anaerobic stimulon in *Neisseria gonorrhoeae*. **BMC Genomics**, v. 12, Jan 2011.

KLASSEN, G. *et al.* Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 887-891, Sep 1997.

KOLESNIKOW, T.; SCHRODER, I.; GUNSALUS, R. P. Regulation of *narK* gene-expression in *Escherichia coli* in response to anaerobiosis, nitrate, iron, and molybdenum. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 22, p. 7104-7111, Nov 1992.

LI, J.; STEWART, V. Localization of upstream sequence elements required for nitrate and anaerobic induction of *fdn* (formate dehydrogenase-N) operon expression in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 15, p. 4935-42, Aug 1992.

LIN, J. T.; GOLDMAN, B. S.; STEWART, V. Structures of genes *nasA* and *nasB*, encoding assimilatory nitrate and nitrite reductases in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 8, p. 2370-2378, Apr 1993.

LIN, J. T.; GOLDMAN, B. S.; STEWART, V. The *nasFEDCBA* operon for nitrate and nitrite assimilation in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 9, p. 2551-2559, May 1994.

LIN, J. T.; STEWART, V. Nitrate and nitrite-mediated transcription antitermination control of *nasF* (nitrate assimilation) operon expression in *Klebsiella pneumoniae* M5a1. **Journal of Molecular Biology**, v. 256, n. 3, p. 423-435, Mar 1996.

LIU, X. L.; DEMOSS, J. A. Characterization of NarJ, a system-specific chaperone required for nitrate reductase biogenesis in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 39, p. 24266-24271, Sep 1997.

LUQUE, I.; FLORES, E.; HERRERO, A. Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. **Embo Journal**, v. 13, n. 12, p. 2862-2869, Jun 1994.

MAGALHÃES CRUZ, L. *et al.* 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2375-9, May 2001.

MALM, S. *et al.* The roles of the nitrate reductase NarGHJI, the nitrite reductase NirBD and the response regulator GlnR in nitrate assimilation of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology-Sgm**, v. 155, p. 1332-1339, Apr 2009.

MARGER, M. D.; SAIER, M. H. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 18, n. 1, p. 13-20, Jan 1993.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in Bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 4, p. 604-611, Dec 1995.

MIGUEL, A. B. **Análise de regiões regulatórias dos genes do metabolismo de nitrato em *Herbaspirillum seropedicae***. 2011. EVINCI Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MIKAMI, B.; IDA, S. Purification and properties of ferredoxin nitrate reductase from the *Cyanobacterium plectonema boryanum*. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 791, n. 3, p. 294-304, 1984.

MILLER, J. H. **A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.

MOIR, J. W. B.; WOOD, N. J. Nitrate and nitrite transport in bacteria. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 2, p. 215-224, Feb 2001.

MORENO-VIVIÁN, C. *et al.* Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 21, p. 6573-84, Nov 1999.

MOROZKINA, E. V.; ZVYAGILSKAYA, R. A. Nitrate reductases: Structure, functions, and effect of stress factors. **Biochemistry-Moscow**, v. 72, n. 10, p. 1151-1160, Oct 2007.

MORTAZAVI, A. *et al.* Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature Methods**, v. 5, n. 7, p. 621-628, Jul 2008.

MUNCH, R. *et al.* Virtual footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. **Bioinformatics**, v. 21, n. 22, p. 4187-4189, Nov 2005.

NISHIMURA, T. *et al.* Anaerobic growth of *Corynebacterium glutamicum* using nitrate as a terminal electron acceptor. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v. 75, n. 4, p. 889-97, Jun 2007.

NORIEGA, C. E. *et al.* Asymmetric cross-regulation between the nitrate-responsive NarX-NarL and NarQ-NarP two-component regulatory systems from *Escherichia coli* K-12. **Molecular Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 394-412, Jan 2010.

OLIVARES, F. L. *et al.* Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp in roots, stems, and leaves, predominantly of *Gramineae*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, n. 3, p. 197-200, Feb 1996.

OLIVEIRA, L. T. D. **Construção e caracterização da estirpe mutante *narL* de *Herbaspirillum seropedicae***. 2008. 67 f Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

OMATA, T. Structure, function and regulation of the nitrate transport-system of the cyanobacterium *Synechococcus* sp PCC7942. **Plant and Cell Physiology**, v. 36, n. 2, p. 207-213, Mar 1995.

OSAKI, J. H. **Caracterização funcional da proteína NtrX de *Herbaspirillum seropedicae***. 2009. 83 f Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

PAO, S. S.; PAULSEN, I. T.; SAIER, M. H. Major facilitator superfamily. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 1, Mar 1998.

PASSALACQUA, K. D. *et al.* Structure and Complexity of a Bacterial Transcriptome. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 10, p. 3203-3211, May 2009.

PAWLOWSKI, K.; KLOSSE, U.; DEBRUIJN, F. J. Characterization of a novel *Azorhizobium caulinodans* ORS571 two-component regulatory system, NtrY/NtrX, involved in nitrogen-fixation and metabolism. **Molecular & General Genetics**, v. 231, n. 1, p. 124-138, Dec 1991.

PEDROSA, F. O. *et al.* Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. **Plos Genetics**, v. 7, n. 5, May 2011.

PERSUHN, D. C. *et al.* The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of glutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 192, n. 2, p. 217-21, Nov 2000.

PHILIPPOT, L.; HOJBERG, O. Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. **Biochimica Et Biophysica Acta-Genes Structure and Expression**, v. 1446, n. 1-2, p. 1-23, Jul 7 1999.

POOLE, R. K.; HUGHES, M. N. New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 775-783, May 2000.

RICHARDSON, D. J. *et al.* Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 2, p. 165-178, Feb 2001.

RICHARDSON, D. J.; WATMOUGH, N. J. Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 3, n. 2, p. 207-219, Apr 1999.

RONCATO-MACCARI, L. D. B. *et al.* Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, n. 1, p. 39-47, Jul 1 2003.

RUBIO, L. M.; FLORES, E.; HERRERO, A. Molybdopterin guanine dinucleotide cofactor in *Synechococcus* sp nitrate reductase: identification of *mobA* and isolation of a putative *moeB* gene. **Febs Letters**, v. 462, n. 3, p. 358-362, Dec 3 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHREIBER, K. *et al.* The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 11, p. 4310-4314, Jun 2007.

SCHRODER, I.; DARIE, S.; GUNSALUS, R. P. Activation of the *Escherichia coli* nitrate reductase (NarGHJI) operon by NarL and Fnr requires integration host factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 2, p. 771-774, Jan 15 1993.

SELF, W. T. *et al.* Transcriptional regulation of molybdoenzyme synthesis in *Escherichia coli* in response to molybdenum: ModE-molybdate, a repressor of the *modABCD* (molybdate transport) operon is a secondary transcriptional activator for the *hyc* and *nar* operons. **Microbiology-Uk**, v. 145, p. 41-55, Jan 1999.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PUHLER, A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. **Bio-Technology**, v. 1, n. 9, p. 784-791, 1983.

SOUZA, E. M. *et al.* Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC and NifA binding sites and of the -24/-12 promoter element. **Microbiology-Uk**, v. 146, p. 1407-1418, Jun 2000.

SPAINK, H. P. *et al.* Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1Jl. **Plant Molecular Biology**, v. 9, n. 1, p. 27-39, 1987

SPIRO, S.; GUEST, J. R. FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Rev**, v. 6, n. 4, p. 399-428, Aug 1990.

STEINMETZ, M. *et al.* Genetic analysis of *sacB*, the structural gene of a secreted enzyme, levansucrase of *Bacillus subtilis* Marburg. **Molecular & General Genetics**, v. 191, n. 1, p. 138-144, 1983.

STEWART, V. Requirement of Fnr and NarL functions for nitrate reductase expression in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 151, n. 3, p. 1320-1325, 1982.

STEWART, V.; BLEDSOE, P. J. Synthetic *lac* operator substitutions for studying the nitrate- and nitrite-responsive NarX-NarL and NarQ-NarP two-component regulatory systems of *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 7, p. 2104-2111, Apr 2003.

SUZUKI, I. *et al.* Identification and characterization of two nitrogen-regulated gene of the cyanobacterium *Synechococcus* sp strain PCC7942 required for maximum efficiency of nitrogen assimilation. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 2, p. 290-296, Jan 1995.

TADRA-SFEIR, M. Z. **Caracterização Funcional de genes de *Herbaspirillum seropedicae* regulados pelo flavonóide naringenina**. 2011. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

TYSON, K. L. *et al.* Definition of nitrite and nitrate response elements at the anaerobically inducible *Escherichia coli nirB* promoter: interactions between FNR and NarL. **Molecular Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 151-7, Jan 1993.

VINE, C. E.; COLE, J. A. Unresolved sources, sinks, and pathways for the recovery of enteric bacteria from nitrosative stress. **FEMS Microbiology Letters**, v. 325, n. 2, p. 99-107, Dec 2011.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57-63, Jan 2009.

WOODLEY, P.; BUCK, M.; KENNEDY, C. Identification of sequences important for recognition of *vnf* genes by the VnfA transcriptional activator in *Azotobacter vinelandii*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 135, n. 2-3, p. 213-221, Jan 1996.

WU, Q. T.; STEWART, V. NasFED proteins mediate assimilatory nitrate and nitrite transport in *Klebsiella oxytoca* (pneumoniae) M5a1. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 5, p. 1311-1322, Mar 1998.

WU, S. Q. T. *et al.* General nitrogen regulation of nitrate assimilation regulatory gene *nasR* expression in *Klebsiella oxytoca* M5a1. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 23, p. 7274-7284, Dec 1999.

XU, J. L.; XU, X.; VERSTRAETE, W. Adaptation of *Escherichia coli* cell method for micro-scale nitrate measurement with the Griess reaction in culture media. **Journal of Microbiological Methods**, v. 41, n. 1, p. 23-33, Jun 2000.

ZUMFT, W. G. Cell biology and molecular basis of denitrification. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 4, Dec 1997.

ANEXOS

ANEXO 1 - Nível de transcrição diferencial em nitrato dos genes induzidos na presença de nitrato

Nome do gene	Nível de transcrição diferencial em nitrato ¹		
<i>narU</i>	10623,0	<i>msrA</i> (NC_014323 744939..745491)	9,9
<i>narG</i>	2897,5	<i>Hsero_1294</i>	9,7
<i>narK1</i>	2660,0	<i>Hsero_0187</i>	9,6
<i>narH</i>	1152,6	<i>rpoN</i>	9,5
<i>narI</i>	886,2	<i>infA</i> (NC_014323 143949..144168)	9,3
<i>Hsero_2508</i>	852,9	<i>Hsero_4101</i>	9,1
<i>narJ</i>	719,3	<i>Hsero_3256</i>	9,0
<i>moaA</i> (NC_014323 4178732..4179734)	391,3	<i>Hsero_4040</i>	8,7
<i>flgH</i> (NC_014323 5444222..5444888)	107,2	<i>phbF</i>	8,5
<i>cstA</i>	72,9	<i>cysH</i>	8,4
<i>Hsero_1964</i>	65,7	<i>Hsero_4196</i>	8,2
<i>Hsero_1583</i>	51,6	<i>livG</i> (NC_014323 1887056..1887833)	8,1
<i>Hsero_2071</i>	49,8	<i>Hsero_4093</i>	8,1
<i>Hsero_3135</i>	41,4	<i>Hsero_1558</i>	7,9
<i>yhbH</i>	37,5	<i>livM</i> (NC_014323 1885833..1887060)	7,8
<i>Hsero_1875</i>	28,7	<i>Hsero_0898</i>	7,6
<i>copB</i>	23,5	<i>Hsero_3100</i>	7,5
<i>Hsero_3137</i>	22,1	<i>Hsero_4560</i>	7,4
<i>eriC</i> (NC_014323 1815006..1816725)	21,1	<i>Hsero_0233</i>	7,2
<i>Hsero_4086</i>	17,5	<i>Hsero_3477</i>	7,2
<i>accB</i> (NC_014323 4711979..4712228)	17,4	<i>hlyB</i>	7,1
<i>copA</i> (NC_014323 1826526..1827915)	17,1	<i>Hsero_0876</i>	6,9
<i>Hsero_2711</i>	16,3	<i>Hsero_4035</i>	6,9
<i>cspD</i> (NC_014323 1599606..1599813)	14,4	<i>Hsero_4647</i>	6,9
<i>Hsero_3386</i>	14,3	<i>galT</i>	6,9
<i>narL</i>	13,5	<i>aceF</i>	6,9
<i>tauA</i> (NC_014323 3887592..3888654)	12,3	<i>tauB</i> (NC_014323 3885543..3886371)	6,8
<i>acpP</i> (NC_014323 4813635..4813863)	12,2	<i>livF</i> (NC_014323 1887829..1888537)	6,7
<i>Hsero_0326</i>	12,0	<i>panD</i>	6,5
<i>cspD</i> (NC_014323 3448266..3448473)	11,9	<i>Hsero_2978</i>	6,5
<i>narK</i>	11,3	<i>Hsero_2355</i>	6,3
<i>tauA</i> (NC_014323 3886513..3887527)	10,8	<i>glnH</i> (NC_014323 4023692..4024442)	6,3
<i>tauC</i> (NC_014323 3884658..3885513)	10,2	<i>cysN</i>	6,2
<i>Hsero_0693</i>	10,0	<i>narX</i>	6,0
		<i>Hsero_3466</i>	6,0
		<i>Hsero_3483</i>	6,0
		<i>Hsero_2510</i>	5,9
		<i>Hsero_4750</i>	5,8
		<i>Hsero_2724</i>	5,7
		<i>cysD</i>	5,7
		<i>acnA</i> (NC_014323 3392425..3395137)	5,6
		<i>phbA2</i>	5,5

<i>wecB</i> (NC_014323 4826976..4828107)	5,5
<i>Hsero_4748</i>	5,5
<i>rpmG</i>	5,4
<i>Hsero_3636</i>	5,4
<i>Hsero_3478</i>	5,4
<i>sdhB</i>	5,3
<i>qor</i> (NC_014323 4075275..4076250)	5,2
<i>potA</i> (NC_014323 1194993..1196124)	5,1
<i>lpdA</i> (NC_014323 3376897..3378325)	5,0
<i>sdhC</i>	5,0
<i>Hsero_4323</i>	5,0
<i>Hsero_0025</i>	5,0
<i>guaD</i>	5,0
<i>Hsero_2723</i>	4,9
<i>Hsero_1897</i>	4,9
<i>Hsero_4199</i>	4,8
<i>petC</i>	4,8
<i>cyoD</i>	4,8
<i>Hsero_3594</i>	4,7
<i>cysI</i>	4,7
<i>Hsero_4207</i>	4,6
<i>Hsero_0875</i>	4,6
<i>nuoK</i>	4,6
<i>pnp</i>	4,6
<i>Hsero_3227</i>	4,6
<i>uspA</i> (NC_014323 4449785..4450223)	4,6
<i>Hsero_4374</i>	4,6
<i>potH</i>	4,5
<i>Hsero_3323</i>	4,4
<i>Hsero_2928</i>	4,4
<i>fabH</i> (NC_014323 4812704..4813649)	4,4
<i>Hsero_4559</i>	4,4
<i>Hsero_2354</i>	4,4
<i>ssuA</i> (NC_014323 1816983..1817994)	4,4
<i>Hsero_2512</i>	4,3
<i>sucB</i>	4,3
<i>Hsero_4360</i>	4,3
<i>Hsero_4104</i>	4,3
<i>fadB</i>	4,3
<i>Hsero_0983</i>	4,2
<i>tonB</i> (NC_014323 754091..754790)	4,2
<i>Hsero_3710</i>	4,2
<i>Hsero_3486</i>	4,2
<i>Hsero_3482</i>	4,2
<i>Hsero_3484</i>	4,1
<i>fhuA</i> (NC_014323 1715335..1717483)	4,1
<i>Hsero_3426</i>	4,1

<i>Hsero_0498</i>	4,1
<i>sucA</i>	4,1
<i>wecE</i>	4,1
<i>Hsero_0468</i>	4,0
<i>icd</i> (NC_014323 2865718..2867947)	4,0
<i>cyoC</i>	4,0
<i>Hsero_3481</i>	4,0
<i>livH</i> (NC_014323 184041..184971)	3,9
<i>Hsero_1600</i>	3,9
<i>rplL</i>	3,9
<i>ftsZ</i>	3,9
<i>Hsero_3588</i>	3,9
<i>Hsero_1961</i>	3,9
<i>yjgF</i>	3,8
<i>gltA</i>	3,8
<i>Hsero_2971</i>	3,8
<i>Hsero_4091</i>	3,8
<i>mesJ</i> (NC_014323 4807882..4809115)	3,8
<i>ackA</i>	3,8
<i>acpP</i> (NC_014323 2183561..2183801)	3,8
<i>Hsero_3129</i>	3,8
<i>bfd</i>	3,7
<i>Hsero_1246</i>	3,7
<i>lpdA</i> (NC_014323 1677209..1679000)	3,7
<i>ispF</i>	3,7
<i>Hsero_2810</i>	3,7
<i>Hsero_1892</i>	3,7
<i>Hsero_2351</i>	3,6
<i>Hsero_4090</i>	3,6
<i>Hsero_4678</i>	3,6
<i>Hsero_0036</i>	3,6
<i>pdxH</i>	3,6
<i>Hsero_4096</i>	3,5
<i>Hsero_0880</i>	3,5
<i>Hsero_3648</i>	3,5
<i>Hsero_4428</i>	3,5
<i>Hsero_4198</i>	3,5
<i>sdhA</i>	3,5
<i>atoD</i>	3,5
<i>kdtB</i>	3,5
<i>Hsero_3476</i>	3,5
<i>rfaJ</i> (NC_014323 4091626..4092613)	3,5
<i>Hsero_2966</i>	3,5
<i>Hsero_3273</i>	3,5
<i>asnB</i> (NC_014323 4805478..4807350)	3,5
<i>exbD</i> (NC_014323 752890..753307)	3,5
<i>cyoB</i>	3,5
<i>ftsW</i> (NC_014323)	3,4

5356279..5357389)	
Hsero_4103	3,4
Hsero_0074	3,4
Hsero_3687	3,4
phbA	3,4
amn	3,4
exbB (NC_014323 753306..754038)	3,4
pncB (NC_014323 1851488..1852697)	3,4
sbp	3,4
gltD	3,4
ilvH	3,4
hemL	3,3
Hsero_3713	3,3
dsbC	3,3
Hsero_4205	3,3
Hsero_2400	3,3
Hsero_1295	3,3
Hsero_4648	3,3
recX	3,3
Hsero_0257	3,3
glnP (NC_014323 4023005..4023662)	3,3
Hsero_4683	3,2
Hsero_2789	3,2
Hsero_1760	3,2
Hsero_4095	3,2
Hsero_1480	3,2
Hsero_3485	3,2
Hsero_4267	3,2
nahD (NC_014323 648435..649041)	3,2
Hsero_4214	3,2
Hsero_2399	3,2
fabF (NC_014323 4254418..4255663)	3,2
Hsero_4561	3,2
Hsero_2187	3,2
exaC	3,1
fdx (NC_014323 4924831..4925152)	3,1
galE (NC_014323 4799395..4800469)	3,1
Hsero_3421	3,1
phaC (NC_014323 278252..279383)	3,1
cheD1	3,1
Hsero_4401	3,1
gloA (NC_014323 587596..587992)	3,1
Hsero_4745	3,1
cydB	3,0
Hsero_0921	3,0
Hsero_0005	3,0
Hsero_3464	3,0

Hsero_3693	3,0
petA	3,0
Hsero_0578	3,0
Hsero_3880	3,0
Hsero_1115	3,0
shb1	3,0
Hsero_4097	3,0
Hsero_2080	3,0
pntAb	3,0
Hsero_3635	2,9
Hsero_0234	2,9
Hsero_3851	2,9
Hsero_3215	2,9
Hsero_2811	2,9
Hsero_4307	2,9
Hsero_4036	2,9
Hsero_4034	2,9
Hsero_3371	2,9
Hsero_4684	2,9
aroA	2,9
nuoL	2,8
cydA	2,8
Hsero_4170	2,8
potC (NC_014323 1191315..1192149)	2,8
tsr (NC_014323 3998724..4000353)	2,8
gltB	2,8
Hsero_0501	2,8
Hsero_4793	2,8
pyrR	2,8
dnaN	2,7
Hsero_4137	2,7
Hsero_0532	2,7
Hsero_4221	2,7
adhA	2,7
Hsero_2207	2,7
dut	2,7
Hsero_3487	2,7
livG (NC_014323 186255..187023)	2,7
Hsero_0963	2,7
Hsero_0920	2,7
Hsero_0721	2,7
trpG	2,7
trxB (NC_014323 2159395..2160352)	2,7
Hsero_0507	2,7
Hsero_4060	2,6
Hsero_1391	2,6
Hsero_0395	2,6
Hsero_3847	2,6
nuoM	2,6
cysW	2,6
Hsero_0352	2,6

<i>Hsero_1916</i>	2,6
<i>acnA</i> (NC_014323 2580904..2583526)	2,6
<i>fixO</i>	2,6
<i>Hsero_3979</i>	2,6
<i>Hsero_0497</i>	2,6
<i>leuD</i>	2,5
<i>Hsero_0913</i>	2,5
<i>Hsero_3512</i>	2,5
<i>Hsero_3995</i>	2,5
<i>Hsero_0006</i>	2,5
<i>fecl</i> (NC_014323 5125856..5126366)	2,5
<i>Hsero_0474</i>	2,5
<i>gst</i> (NC_014323 4900832..4901534)	2,5
<i>Hsero_4041</i>	2,5
<i>fabG</i> (NC_014323 4253684..4254422)	2,5
<i>Hsero_2441</i>	2,4
<i>Hsero_3284</i>	2,4
<i>Hsero_0499</i>	2,4
<i>Hsero_2808</i>	2,4
<i>pyrB</i>	2,4
<i>Hsero_4340</i>	2,4
<i>rplQ</i>	2,4
<i>fixP</i>	2,4
<i>livH</i> (NC_014323 1884854..1885781)	2,4
<i>Hsero_0517</i>	2,4
<i>Hsero_3810</i>	2,4
<i>Hsero_1615</i>	2,4
<i>ilvC</i> (NC_014323 1965924..1966941)	2,4
<i>atoA</i>	2,4
<i>pntB</i>	2,4
<i>Hsero_0874</i>	2,4
<i>Hsero_3593</i>	2,4
<i>Hsero_3857</i>	2,3
<i>Hsero_3134</i>	2,3
<i>cyoA</i>	2,3
<i>fdxB</i>	2,3
<i>dapD</i>	2,3
<i>Hsero_3479</i>	2,3
<i>gst</i> (NC_014323 3429758..3430451)	2,3
<i>Hsero_0564</i>	2,3
<i>hydH</i>	2,3
<i>asnB</i> (NC_014323 4820787..4822671)	2,3
<i>engB</i>	2,3
<i>fixG</i>	2,3
<i>Hsero_2916</i>	2,3
<i>Hsero_4795</i>	2,3
<i>Hsero_3717</i>	2,3
<i>Hsero_2353</i>	2,3

<i>rfbD</i>	2,2
<i>trxA1</i>	2,2
<i>tsr</i> (NC_014323 4031424..4032999)	2,2
<i>rfaG</i>	2,2
<i>catA</i>	2,2
<i>Hsero_2909</i>	2,2
<i>argC</i> (NC_014323 3190662..3191592)	2,2
<i>Hsero_0392</i>	2,2
<i>Hsero_3679</i>	2,2
<i>nitR</i>	2,2
<i>Hsero_4341</i>	2,2
<i>Hsero_3811</i>	2,2
<i>Hsero_3495</i>	2,2
<i>phoH</i> (NC_014323 2341075..2342776)	2,2
<i>Hsero_1366</i>	2,2
<i>paaF</i>	2,2
<i>Hsero_1338</i>	2,2
<i>era</i>	2,2
<i>Hsero_0073</i>	2,2
<i>Hsero_0516</i>	2,2
<i>Hsero_4243</i>	2,2
<i>Hsero_3590</i>	2,1
<i>Hsero_4211</i>	2,1
<i>phaZ</i> (NC_014323 1846522..1847758)	2,1
<i>hisH</i> (NC_014323 4809111..4809720)	2,1
<i>Hsero_0591</i>	2,1
<i>cutA</i>	2,1
<i>Hsero_3376</i>	2,1
<i>Hsero_3174</i>	2,1
<i>Hsero_0574</i>	2,1
<i>Hsero_0144</i>	2,1
<i>Hsero_0500</i>	2,1
<i>btuE</i>	2,1
<i>fliE</i>	2,1
<i>Hsero_4792</i>	2,1
<i>Hsero_4105</i>	2,1
<i>Hsero_3592</i>	2,1
<i>ureC</i>	2,1
<i>Hsero_1782</i>	2,1
<i>Hsero_1631</i>	2,1
<i>Hsero_4643</i>	2,1
<i>ubiX</i>	2,1
<i>Hsero_1288</i>	2,1
<i>Hsero_0246</i>	2,1
<i>Hsero_4593</i>	2,1
<i>aceE</i>	2,1
<i>livM</i> (NC_014323 185025..186240)	2,1
<i>Hsero_3375</i>	2,1
<i>Hsero_0529</i>	2,1

<i>Hsero_3680</i>	2,0	<i>ilvI</i>	2,0
<i>Hsero_1204</i>	2,0	<i>fdx</i> (NC_014323 2163911..2164250)	2,0
<i>Hsero_0754</i>	2,0	<i>phbB</i>	2,0
<i>Hsero_3909</i>	2,0	<i>Hsero_4359</i>	2,0
<i>Hsero_2412</i>	2,0	<i>gltK</i> (NC_014323 4412648..4413344)	2,0
<i>pilT</i>	2,0		
<i>Hsero_4777</i>	2,0		

¹O nível de transcrição diferencial em nitrato representa a razão da média ponderada do RPKM das Bibliotecas Nitrato 1 e 2 pela média ponderada do RPKM das Bibliotecas Amônio 1 e 2. Foram considerados apenas os genes que apresentaram diferença de pelo menos duas vezes na razão do valor de RPKM da biblioteca Nitrato pelo valor de RPKM da Biblioteca Amônio, *p*-valor < 0,05 e cobertura maior que 5x (seção 4.1).

ANEXO 2 - Nível de transcrição diferencial em nitrato dos genes reprimidos na presença de nitrato

Nome do gene	Nível de transcrição diferencial em nitrato ¹		
<i>Hsero_2473</i>	-772,2	<i>Hsero_2690</i>	-33,3
<i>Hsero_2362</i>	-420,2	<i>Hsero_4579</i>	-32,6
<i>Hsero_2565</i>	-188,9	<i>Hsero_4620</i>	-32,5
<i>Hsero_2563</i>	-171,5	<i>Hsero_2559</i>	-32,1
<i>Hsero_4702</i>	-133,1	<i>Hsero_3724</i>	-31,6
<i>Hsero_2228</i>	-106,0	<i>Hsero_1234</i>	-30,8
<i>Hsero_2799</i>	-105,8	<i>Hsero_2787</i>	-30,7
<i>Hsero_3748</i>	-99,3	<i>Hsero_1232</i>	-30,5
<i>Hsero_1986</i>	-93,7	<i>Hsero_2363</i>	-30,4
<i>cheB</i> (NC_014323 1926121..1927183)	-86,9	<i>Hsero_3725</i>	-30,4
<i>cheA</i> (NC_014323 2807639..2810066)	-80,0	<i>otsB</i>	-30,0
<i>Hsero_2740</i>	-77,8	<i>Hsero_0585</i>	-29,0
<i>Hsero_2369</i>	-77,2	<i>Hsero_1457</i>	-28,6
<i>paaK</i> (NC_014323 2919595..2920867)	-76,2	<i>Hsero_4015</i>	-27,7
<i>Hsero_0440</i>	-71,0	<i>Hsero_4578</i>	-27,6
<i>Hsero_2361</i>	-69,7	<i>Hsero_4621</i>	-27,5
<i>Hsero_2564</i>	-68,0	<i>livH</i> (NC_014323 4586115..4586982)	-27,1
<i>Hsero_2359</i>	-67,4	<i>mmsB</i> (NC_014323 3522281..3523175)	-26,6
<i>cheW</i> (NC_014323 1924545..1926096)	-65,7	<i>cheR</i> (NC_014323 1927819..1928662)	-25,6
<i>Hsero_2562</i>	-65,4	<i>Hsero_3746</i>	-25,3
<i>Hsero_1701</i>	-64,0	<i>wza</i>	-25,0
<i>Hsero_0490</i>	-62,6	<i>Hsero_3381</i>	-24,9
<i>Hsero_3185</i>	-60,2	<i>Hsero_1985</i>	-24,2
<i>Hsero_2155</i>	-58,8	<i>Hsero_3503</i>	-24,2
<i>Hsero_1698</i>	-58,0	<i>Hsero_1613</i>	-23,8
<i>Hsero_1043</i>	-55,8	<i>Hsero_4056</i>	-23,6
<i>mgtA</i>	-55,7	<i>Hsero_1034</i>	-23,5
<i>Hsero_0443</i>	-55,7	<i>Hsero_0066</i>	-23,1
<i>Hsero_0941</i>	-46,2	<i>Hsero_3190</i>	-22,9
<i>Hsero_3544</i>	-45,8	<i>modA1</i>	-22,7
<i>fadD</i> (NC_014323 2926487..2928449)	-43,4	<i>Hsero_2566</i>	-22,5
<i>Hsero_2368</i>	-41,8	<i>cheD4</i>	-22,3
<i>Hsero_1361</i>	-41,4	<i>Hsero_0908</i>	-22,2
<i>Hsero_0528</i>	-41,3	<i>Hsero_1706</i>	-22,1
<i>Hsero_1999</i>	-40,8	<i>tolC</i> (NC_014323 3740252..3741800)	-21,3
<i>Hsero_1363</i>	-39,5	<i>dld</i>	-21,0
<i>Hsero_3068</i>	-38,8	<i>Hsero_4626</i>	-20,9
<i>Hsero_2367</i>	-38,1	<i>Hsero_3749</i>	-20,9
<i>Hsero_2370</i>	-35,1	<i>Hsero_4730</i>	-20,2
<i>Hsero_2739</i>	-34,3	<i>speB</i> (NC_014323 1948439..1949393)	-19,6
<i>Hsero_2365</i>	-34,0	<i>cheA</i> (NC_014323 1929026..1931540)	-19,5
		<i>opuBC</i>	-19,3
		<i>Hsero_2316</i>	-18,9
		<i>Hsero_1690</i>	-18,8
		<i>Hsero_3744</i>	-18,8
		<i>mmsA</i>	-18,8

<i>Hsero_0503</i>	-18,6
<i>Hsero_3732</i>	-18,4
<i>Hsero_0404</i>	-18,3
<i>epsP</i>	-18,0
<i>Hsero_3333</i>	-17,9
<i>Hsero_0080</i>	-17,9
<i>Hsero_1033</i>	-17,7
<i>Hsero_1708</i>	-17,6
<i>Hsero_0441</i>	-17,6
<i>Hsero_1054</i>	-17,6
<i>Hsero_3525</i>	-17,3
<i>Hsero_2357</i>	-17,3
<i>Hsero_3734</i>	-17,2
<i>Hsero_3054</i>	-16,9
<i>dctP</i> (NC_014323 3065119..3065986)	-16,9
<i>Hsero_1233</i>	-16,6
<i>prsA</i>	-16,4
<i>tctC</i>	-16,3
<i>dadA</i> (NC_014323 1907187..1908489)	-16,3
<i>Hsero_0444</i>	-16,0
<i>htpX</i> (NC_014323 2223187..2224066)	-15,9
<i>Hsero_2764</i>	-15,8
<i>Hsero_4531</i>	-15,8
<i>Hsero_1037</i>	-15,7
<i>Hsero_1046</i>	-15,5
<i>rplS</i>	-15,4
<i>Hsero_2104</i>	-15,4
<i>ispA</i>	-15,3
<i>Hsero_3630</i>	-15,2
<i>Hsero_0761</i>	-15,2
<i>Hsero_1372</i>	-15,0
<i>Hsero_1302</i>	-14,9
<i>Hsero_2658</i>	-14,8
<i>livH</i> (NC_014323 2536057..2536993)	-14,8
<i>Hsero_3074</i>	-14,7
<i>Hsero_4385</i>	-14,7
<i>Hsero_3735</i>	-14,7
<i>Hsero_3750</i>	-14,5
<i>Hsero_0442</i>	-14,5
<i>opuBB1</i>	-14,4
<i>Hsero_4674</i>	-14,2
<i>sua5</i> (NC_014323 3756827..3757463)	-14,2
<i>caiA</i> (NC_014323 2902801..2903962)	-14,1
<i>Hsero_0942</i>	-13,9
<i>Hsero_1908</i>	-13,9
<i>rosB</i>	-13,7
<i>ftsL</i>	-13,6
<i>Hsero_1048</i>	-13,5
<i>Hsero_0918</i>	-13,4

<i>Hsero_2145</i>	-13,4
<i>ltdD</i> (NC_014323 2960701..2961844)	-13,4
<i>Hsero_3347</i>	-13,3
<i>Hsero_4594</i>	-13,2
<i>rpoE</i> (NC_014323 3530079..3530667)	-13,1
<i>Hsero_3753</i>	-13,1
<i>Hsero_4255</i>	-13,0
<i>Hsero_4011</i>	-13,0
<i>Hsero_2588</i>	-13,0
<i>Hsero_1015</i>	-13,0
<i>Hsero_0759</i>	-12,9
<i>pcaK</i>	-12,6
<i>mhpD</i> (NC_014323 3841190..3841934)	-12,6
<i>tsr</i> (NC_014323 5198859..5200653)	-12,6
<i>Hsero_1019</i>	-12,6
<i>Hsero_1467</i>	-12,5
<i>Hsero_0979</i>	-12,2
<i>penP</i>	-12,2
<i>mdcG</i>	-12,1
<i>Hsero_1364</i>	-12,1
<i>Hsero_0850</i>	-12,0
<i>pqiA</i> (NC_014323 3932918..3933629)	-12,0
<i>Hsero_0740</i>	-11,9
<i>Hsero_1271</i>	-11,9
<i>htpX</i> (NC_014323 3757559..3758435)	-11,9
<i>greA</i> (NC_014323 1578501..1578978)	-11,8
<i>Hsero_4704</i>	-11,8
<i>truB</i>	-11,8
<i>Hsero_3731</i>	-11,7
<i>Hsero_2534</i>	-11,7
<i>Hsero_1068</i>	-11,7
<i>sseB</i>	-11,5
<i>Hsero_1533</i>	-11,5
<i>pqiA</i> (NC_014323 3933625..3934255)	-11,4
<i>Hsero_4635</i>	-11,3
<i>Hsero_2469</i>	-11,3
<i>nifR3</i>	-11,3
<i>Hsero_2293</i>	-11,3
<i>Hsero_1058</i>	-11,3
<i>Hsero_0452</i>	-11,3
<i>Hsero_4681</i>	-11,2
<i>Hsero_0277</i>	-11,0
<i>phrB</i> (NC_014323 452143..453463)	-11,0
<i>eutC</i>	-10,9
<i>rbsD</i>	-10,9
<i>Hsero_1675</i>	-10,9
<i>Hsero_1381</i>	-10,9

<i>cdh</i>	-10,8
<i>Hsero_0267</i>	-10,8
<i>nifA</i>	-10,8
<i>Hsero_3332</i>	-10,5
<i>Hsero_2667</i>	-10,5
<i>Hsero_2008</i>	-10,5
<i>Hsero_1038</i>	-10,5
<i>ugd</i>	-10,4
<i>rpsU</i>	-10,4
<i>Hsero_1047</i>	-10,3
<i>Hsero_0306</i>	-10,3
<i>xseB</i>	-10,3
<i>groEL</i>	-10,3
<i>ompC</i> (NC_014323 4591136..4592234)	-10,2
<i>Hsero_3011</i>	-10,1
<i>cheY</i> (NC_014323 1931916..1932297)	-10,0
<i>Hsero_0763</i>	-9,9
<i>Hsero_1059</i>	-9,9
<i>Hsero_2673</i>	-9,8
<i>tar</i> (NC_014323 2282874..2284536)	-9,7
<i>Hsero_2926</i>	-9,7
<i>Hsero_2790</i>	-9,7
<i>paaJ</i> (NC_014323 4597085..4598339)	-9,7
<i>Hsero_2294</i>	-9,7
<i>Hsero_1317</i>	-9,6
<i>Hsero_0621</i>	-9,6
<i>tsaA</i>	-9,6
<i>Hsero_2281</i>	-9,5
<i>fabG</i> (NC_014323 4006385..4007141)	-9,5
<i>Hsero_1225</i>	-9,5
<i>Hsero_1331</i>	-9,5
<i>Hsero_1055</i>	-9,5
<i>Hsero_1709</i>	-9,4
<i>livG</i> (NC_014323 4584332..4585106)	-9,4
<i>Hsero_3132</i>	-9,3
<i>Hsero_2697</i>	-9,3
<i>accD</i> (NC_014323 3060287..3061184)	-9,3
<i>Hsero_0361</i>	-9,3
<i>Hsero_4023</i>	-9,2
<i>Hsero_2523</i>	-9,2
<i>Hsero_1676</i>	-9,2
<i>Hsero_2372</i>	-9,1
<i>Hsero_4278</i>	-9,1
<i>Hsero_3304</i>	-9,1
<i>fabD</i> (NC_014323 3056950..3057895)	-9,0
<i>Hsero_3000</i>	-9,0
<i>Hsero_4024</i>	-9,0
<i>cheY</i> (NC_014323)	-8,9

1928658..1929030)	
<i>Hsero_4451</i>	-8,8
<i>Hsero_2577</i>	-8,8
<i>Hsero_1738</i>	-8,8
<i>Hsero_0198</i>	-8,7
<i>Hsero_2783</i>	-8,6
<i>Hsero_0521</i>	-8,6
<i>Hsero_1642</i>	-8,6
<i>Hsero_3927</i>	-8,6
<i>Hsero_4294</i>	-8,6
<i>Hsero_4337</i>	-8,6
<i>Hsero_1041</i>	-8,5
<i>Hsero_0042</i>	-8,5
<i>Hsero_3010</i>	-8,5
<i>Hsero_4022</i>	-8,5
<i>cheD</i> (NC_014323 3105826..3107566)	-8,5
<i>livM</i> (NC_014323 4585102..4586119)	-8,5
<i>Hsero_2360</i>	-8,4
<i>livF</i> (NC_014323 4583638..4584340)	-8,3
<i>exbD</i> (NC_014323 1378349..1378784)	-8,3
<i>Hsero_4630</i>	-8,2
<i>glcD</i>	-8,1
<i>Hsero_0737</i>	-8,1
<i>Hsero_1552</i>	-8,1
<i>Hsero_4156</i>	-8,1
<i>Hsero_1707</i>	-8,0
<i>Hsero_4083</i>	-8,0
<i>tmB</i>	-8,0
<i>rsuA</i> (NC_014323 4136880..4138563)	-7,9
<i>ribF</i>	-7,9
<i>Hsero_0760</i>	-7,9
<i>tsr</i> (NC_014323 785664..787308)	-7,9
<i>Hsero_1268</i>	-7,8
<i>Hsero_0741</i>	-7,8
<i>Hsero_0917</i>	-7,8
<i>Hsero_3736</i>	-7,8
<i>Hsero_3823</i>	-7,7
<i>zntA</i>	-7,7
<i>mdcA</i>	-7,7
<i>Hsero_2212</i>	-7,6
<i>Hsero_4252</i>	-7,6
<i>Hsero_3002</i>	-7,6
<i>Hsero_1800</i>	-7,6
<i>rimM</i>	-7,6
<i>Hsero_3726</i>	-7,6
<i>pldA</i>	-7,6
<i>Hsero_3562</i>	-7,5
<i>Hsero_0322</i>	-7,5
<i>cyaY</i>	-7,5
<i>Hsero_3031</i>	-7,5

<i>Hsero_0416</i>	-7,5
<i>lolE</i>	-7,5
<i>Hsero_0746</i>	-7,4
<i>creA</i>	-7,4
<i>Hsero_3733</i>	-7,4
<i>Hsero_0855</i>	-7,4
<i>Hsero_3548</i>	-7,3
<i>tolQ</i>	-7,3
<i>xylF</i>	-7,2
<i>Hsero_3309</i>	-7,2
<i>Hsero_3214</i>	-7,2
<i>Hsero_3727</i>	-7,2
<i>Hsero_1040</i>	-7,2
<i>Hsero_0944</i>	-7,1
<i>Hsero_2478</i>	-7,1
<i>Hsero_4224</i>	-7,1
<i>Hsero_4763</i>	-7,1
<i>Hsero_4007</i>	-7,1
<i>infA</i> (NC_014323 395921..396185)	-7,0
<i>qor</i> (NC_014323 1995458..1996436)	-7,0
<i>modE2</i>	-7,0
<i>Hsero_1920</i>	-6,9
<i>Hsero_0755</i>	-6,9
<i>Hsero_2373</i>	-6,8
<i>rhtB</i> (NC_014323 2127073..2127733)	-6,8
<i>Hsero_1441</i>	-6,7
<i>rpsP</i>	-6,7
<i>galE</i> (NC_014323 2272849..2273881)	-6,7
<i>Hsero_3541</i>	-6,7
<i>Hsero_4627</i>	-6,6
<i>Hsero_4600</i>	-6,6
<i>crtB</i>	-6,6
<i>Hsero_3799</i>	-6,6
<i>rpoH</i>	-6,5
<i>wzxC</i>	-6,5
<i>Hsero_4223</i>	-6,5
<i>Hsero_3720</i>	-6,5
<i>Hsero_2257</i>	-6,4
<i>Hsero_1013</i>	-6,4
<i>Hsero_3467</i>	-6,4
<i>Hsero_2424</i>	-6,4
<i>Hsero_1039</i>	-6,4
<i>livF</i> (NC_014323 5340123..5340828)	-6,4
<i>araJ</i> (NC_014323 3673987..3675145)	-6,3
<i>Hsero_0344</i>	-6,3
<i>Hsero_2252</i>	-6,3
<i>Hsero_0045</i>	-6,3
<i>Hsero_3668</i>	-6,3
<i>cdsA</i> (NC_014323 2458026..2458854)	-6,3

<i>Hsero_4634</i>	-6,3
<i>Hsero_0738</i>	-6,3
<i>Hsero_1241</i>	-6,3
<i>Hsero_3754</i>	-6,3
<i>Hsero_0764</i>	-6,3
<i>glcF</i>	-6,3
<i>sua5</i> (NC_014323 739828..740872)	-6,2
<i>Hsero_3980</i>	-6,2
<i>Hsero_2371</i>	-6,2
<i>Hsero_1053</i>	-6,2
<i>Hsero_2717</i>	-6,2
<i>glcE</i>	-6,2
<i>Hsero_3819</i>	-6,2
<i>Hsero_0169</i>	-6,2
<i>Hsero_1325</i>	-6,1
<i>Hsero_2465</i>	-6,1
<i>Hsero_2553</i>	-6,1
<i>phd</i>	-6,1
<i>Hsero_3751</i>	-6,0
<i>Hsero_1539</i>	-6,0
<i>Hsero_1333</i>	-6,0
<i>pheT</i>	-6,0
<i>Hsero_2091</i>	-6,0
<i>Hsero_1443</i>	-6,0
<i>Hsero_2689</i>	-6,0
<i>livG</i> (NC_014323 2019164..2021132)	-6,0
<i>Hsero_2903</i>	-6,0
<i>gst</i> (NC_014323 1775062..1775692)	-5,9
<i>potA</i> (NC_014323 5191041..5192130)	-5,9
<i>Hsero_1276</i>	-5,9
<i>Hsero_1510</i>	-5,9
<i>xylB</i> (NC_014323 484957..486430)	-5,9
<i>rpsO</i>	-5,9
<i>Hsero_0731</i>	-5,9
<i>Hsero_4575</i>	-5,8
<i>rluC</i>	-5,8
<i>Hsero_0981</i>	-5,8
<i>Hsero_0297</i>	-5,8
<i>Hsero_2002</i>	-5,8
<i>Hsero_1323</i>	-5,8
<i>Hsero_3271</i>	-5,8
<i>Hsero_3608</i>	-5,8
<i>Hsero_2007</i>	-5,8
<i>cheD</i> (NC_014323 1418863..1420588)	-5,8
<i>Hsero_1465</i>	-5,8
<i>tar</i> (NC_014323 4271793..4273509)	-5,7
<i>Hsero_1057</i>	-5,7
<i>Hsero_1614</i>	-5,7
<i>Hsero_2292</i>	-5,7

<i>Hsero_1045</i>	-5,7
<i>Hsero_1733</i>	-5,7
<i>Hsero_1840</i>	-5,7
<i>Hsero_4026</i>	-5,7
<i>Hsero_0371</i>	-5,7
<i>Hsero_1879</i>	-5,6
<i>Hsero_2426</i>	-5,6
<i>Hsero_4388</i>	-5,6
<i>Hsero_1044</i>	-5,6
<i>proC</i>	-5,6
<i>eutB</i>	-5,5
<i>dctQ</i> (NC_014323 3064544..3065123)	-5,5
<i>dctM</i> (NC_014323 3063198..3064548)	-5,5
<i>Hsero_4253</i>	-5,4
<i>Hsero_0618</i>	-5,4
<i>xylG</i>	-5,4
<i>Hsero_2466</i>	-5,4
<i>Hsero_1029</i>	-5,4
<i>Hsero_1262</i>	-5,4
<i>dadA</i> (NC_014323 5267392..5268679)	-5,4
<i>Hsero_4644</i>	-5,4
<i>xylR</i>	-5,4
<i>Hsero_3869</i>	-5,3
<i>Hsero_0271</i>	-5,3
<i>Hsero_0298</i>	-5,3
<i>Hsero_0309</i>	-5,3
<i>serA</i> (NC_014323 3825846..3826806)	-5,3
<i>Hsero_2548</i>	-5,3
<i>hemF</i>	-5,3
<i>acrA</i>	-5,3
<i>Hsero_2514</i>	-5,3
<i>cfa</i> (NC_014323 1169669..1170881)	-5,2
<i>Hsero_1955</i>	-5,2
<i>Hsero_3491</i>	-5,2
<i>Hsero_1318</i>	-5,2
<i>Hsero_2415</i>	-5,2
<i>Hsero_4510</i>	-5,2
<i>Hsero_3508</i>	-5,2
<i>rpoE</i> (NC_014323 3072077..3072569)	-5,2
<i>gltP</i>	-5,1
<i>Hsero_0945</i>	-5,1
<i>Hsero_2939</i>	-5,1
<i>Hsero_2210</i>	-5,1
<i>Hsero_2622</i>	-5,1
<i>Hsero_1337</i>	-5,1
<i>Hsero_1637</i>	-5,1
<i>Hsero_1693</i>	-5,1
<i>ttuC</i>	-5,1
<i>opuBB2</i>	-5,1

<i>Hsero_3368</i>	-5,0
<i>Hsero_1536</i>	-5,0
<i>Hsero_1200</i>	-5,0
<i>clpB</i> (NC_014323 2371224..2373810)	-5,0
<i>Hsero_3380</i>	-5,0
<i>Hsero_2204</i>	-5,0
<i>rplO</i>	-5,0
<i>Hsero_2573</i>	-5,0
<i>Hsero_0994</i>	-5,0
<i>Hsero_3606</i>	-5,0
<i>Hsero_1900</i>	-5,0
<i>Hsero_2760</i>	-5,0
<i>nadD</i>	-4,9
<i>obgE</i>	-4,9
<i>Hsero_3632</i>	-4,9
<i>rhIE</i> (NC_014323 3928680..3930213)	-4,9
<i>entB</i> (NC_014323 1509769..1510393)	-4,9
<i>Hsero_4567</i>	-4,9
<i>cheB</i> (NC_014323 3871515..3872151)	-4,9
<i>epsQ</i>	-4,8
<i>Hsero_0727</i>	-4,8
<i>Hsero_4229</i>	-4,8
<i>Hsero_0307</i>	-4,8
<i>Hsero_3702</i>	-4,8
<i>Hsero_3367</i>	-4,8
<i>Hsero_2987</i>	-4,8
<i>Hsero_3329</i>	-4,8
<i>Hsero_1152</i>	-4,8
<i>Hsero_0627</i>	-4,8
<i>napH</i>	-4,8
<i>Hsero_2285</i>	-4,8
<i>Hsero_3338</i>	-4,8
<i>Hsero_0653</i>	-4,7
<i>Hsero_3507</i>	-4,7
<i>speB</i> (NC_014323 75470..76379)	-4,7
<i>caiD</i> (NC_014323 2902000..2902783)	-4,7
<i>corR</i>	-4,7
<i>livH</i> (NC_014323 2018269..2019160)	-4,7
<i>Hsero_2991</i>	-4,7
<i>Hsero_4740</i>	-4,7
<i>Hsero_3578</i>	-4,7
<i>cybB</i> (NC_014323 749024..749549)	-4,7
<i>Hsero_1496</i>	-4,7
<i>Hsero_0295</i>	-4,6
<i>Hsero_0424</i>	-4,6
<i>Hsero_1888</i>	-4,6
<i>ugpQ</i> (NC_014323 4148916..4149660)	-4,6
<i>Hsero_1362</i>	-4,6

<i>umuC</i>	-4,6
<i>dctA</i> (NC_014323 5203957..5205295)	-4,6
<i>ilvD</i>	-4,6
<i>prmA</i>	-4,6
<i>Hsero_2490</i>	-4,6
<i>Hsero_4074</i>	-4,6
<i>Hsero_0632</i>	-4,6
<i>Hsero_4618</i>	-4,6
<i>Hsero_0222</i>	-4,6
<i>Hsero_4256</i>	-4,5
<i>Hsero_1155</i>	-4,5
<i>vsrA</i>	-4,5
<i>Hsero_1456</i>	-4,5
<i>mdcC</i>	-4,5
<i>opuA</i>	-4,5
<i>Hsero_0308</i>	-4,5
<i>Hsero_0378</i>	-4,5
<i>Hsero_3834</i>	-4,5
<i>Hsero_1804</i>	-4,5
<i>Hsero_0092</i>	-4,5
<i>bglX</i>	-4,5
<i>arnT</i> (NC_014323 946527..948252)	-4,4
<i>mopI</i>	-4,4
<i>arsC</i> (NC_014323 535481..535835)	-4,4
<i>Hsero_3352</i>	-4,4
<i>aro8</i>	-4,4
<i>Hsero_2904</i>	-4,4
<i>xthA</i> (NC_014323 5365062..5365839)	-4,4
<i>Hsero_4162</i>	-4,4
<i>Hsero_4731</i>	-4,4
<i>rpmF</i>	-4,4
<i>rplI</i>	-4,4
<i>Hsero_0526</i>	-4,4
<i>dctD1</i>	-4,4
<i>putP</i>	-4,4
<i>rpmA</i>	-4,4
<i>Hsero_0851</i>	-4,4
<i>Hsero_3627</i>	-4,3
<i>rph</i>	-4,3
<i>chlI</i>	-4,3
<i>Hsero_1739</i>	-4,3
<i>Hsero_3232</i>	-4,3
<i>epsJ</i>	-4,3
<i>rplC</i>	-4,3
<i>Hsero_0489</i>	-4,3
<i>Hsero_1110</i>	-4,2
<i>Hsero_0824</i>	-4,2
<i>azlC</i>	-4,2
<i>cheD</i> (NC_014323 4834674..4835286)	-4,2
<i>iolC</i>	-4,2

<i>Hsero_0159</i>	-4,2
<i>Hsero_1848</i>	-4,2
<i>Hsero_0742</i>	-4,2
<i>glnQ</i> (NC_014323 2586979..2587753)	-4,2
<i>Hsero_1984</i>	-4,2
<i>Hsero_1825</i>	-4,2
<i>Hsero_2414</i>	-4,2
<i>Hsero_4006</i>	-4,2
<i>Hsero_4403</i>	-4,2
<i>Hsero_1551</i>	-4,2
<i>kaiC</i>	-4,2
<i>ftsK2</i>	-4,1
<i>Hsero_1743</i>	-4,1
<i>Hsero_2004</i>	-4,1
<i>pobB</i>	-4,1
<i>Hsero_3522</i>	-4,1
<i>Hsero_1460</i>	-4,1
<i>Hsero_2905</i>	-4,1
<i>Hsero_3728</i>	-4,1
<i>Hsero_2539</i>	-4,1
<i>ygiT</i>	-4,1
<i>cheB</i> (NC_014323 3434057..3435086)	-4,1
<i>Hsero_1830</i>	-4,1
<i>flgA</i>	-4,1
<i>rpsD</i>	-4,1
<i>Hsero_4491</i>	-4,1
<i>hemO</i>	-4,1
<i>Hsero_3785</i>	-4,1
<i>Hsero_4266</i>	-4,1
<i>Hsero_1749</i>	-4,1
<i>ndh</i>	-4,0
<i>Hsero_0299</i>	-4,0
<i>Hsero_0758</i>	-4,0
<i>Hsero_2321</i>	-4,0
<i>Hsero_0766</i>	-4,0
<i>Hsero_0648</i>	-4,0
<i>Hsero_0182</i>	-4,0
<i>rluA</i>	-4,0
<i>Hsero_0695</i>	-4,0
<i>Hsero_1553</i>	-4,0
<i>Hsero_1694</i>	-4,0
<i>cysE</i> (NC_014323 2115187..2115940)	-4,0
<i>gloA</i> (NC_014323 5167247..5167625)	-4,0
<i>Hsero_1534</i>	-4,0
<i>Hsero_2011</i>	-4,0
<i>Hsero_2623</i>	-4,0
<i>Hsero_0734</i>	-4,0
<i>Hsero_0739</i>	-4,0
<i>Hsero_3344</i>	-4,0
<i>Hsero_2453</i>	-4,0
<i>Hsero_0967</i>	-4,0

<i>livK</i> (NC_014323 2016947..2018099)	-4,0
<i>Hsero_2955</i>	-3,9
<i>Hsero_3803</i>	-3,9
<i>Hsero_1500</i>	-3,9
<i>hipB</i>	-3,9
<i>deoC</i>	-3,9
<i>Hsero_3963</i>	-3,9
<i>Hsero_1906</i>	-3,9
<i>Hsero_4654</i>	-3,9
<i>Hsero_3339</i>	-3,9
<i>Hsero_2318</i>	-3,9
<i>Hsero_2708</i>	-3,9
<i>glnB</i>	-3,9
<i>moaC</i>	-3,9
<i>aceA</i>	-3,9
<i>otsA</i>	-3,9
<i>thiF</i>	-3,8
<i>terC</i>	-3,8
<i>Hsero_3870</i>	-3,8
<i>tdcF</i>	-3,8
<i>acs</i> (NC_014323 1006545..1008216)	-3,8
<i>Hsero_1014</i>	-3,8
<i>Hsero_3340</i>	-3,8
<i>Hsero_0030</i>	-3,8
<i>Hsero_2621</i>	-3,8
<i>metX</i> (NC_014323 106755..107895)	-3,8
<i>tctE</i>	-3,8
<i>Hsero_0515</i>	-3,8
<i>carA</i>	-3,8
<i>Hsero_3540</i>	-3,8
<i>Hsero_2393</i>	-3,8
<i>lytB</i>	-3,8
<i>tar</i> (NC_014323 2429485..2431297)	-3,8
<i>Hsero_0067</i>	-3,8
<i>nahD</i> (NC_014323 1443457..1444078)	-3,8
<i>Hsero_3631</i>	-3,8
<i>Hsero_0268</i>	-3,7
<i>mdoH</i>	-3,7
<i>ycaO</i>	-3,7
<i>Hsero_2695</i>	-3,7
<i>gspG</i>	-3,7
<i>Hsero_2479</i>	-3,7
<i>rpmI</i>	-3,7
<i>Hsero_2146</i>	-3,7
<i>Hsero_1027</i>	-3,7
<i>Hsero_2148</i>	-3,7
<i>folB</i>	-3,7
<i>cobT</i>	-3,7
<i>Hsero_1464</i>	-3,7
<i>Hsero_1712</i>	-3,7

<i>marR</i> (NC_014323 3517433..3517910)	-3,7
<i>Hsero_2417</i>	-3,7
<i>Hsero_0046</i>	-3,7
<i>aer</i> (NC_014323 486953..488516)	-3,7
<i>nodD</i>	-3,7
<i>Hsero_3436</i>	-3,6
<i>Hsero_1468</i>	-3,6
<i>flgN</i>	-3,6
<i>mreC</i>	-3,6
<i>Hsero_0622</i>	-3,6
<i>osmY</i>	-3,6
<i>pilA</i>	-3,6
<i>Hsero_0835</i>	-3,6
<i>Hsero_0420</i>	-3,6
<i>gst</i> (NC_014323 1274255..1274903)	-3,6
<i>ibpA</i>	-3,6
<i>phaC</i> (NC_014323 2994000..2996499)	-3,6
<i>plsC</i> (NC_014323 90890..91511)	-3,6
<i>purK</i>	-3,6
<i>Hsero_3910</i>	-3,6
<i>fliO</i>	-3,6
<i>flgI</i>	-3,6
<i>zwf</i>	-3,6
<i>Hsero_1784</i>	-3,6
<i>Hsero_3835</i>	-3,6
<i>Hsero_2540</i>	-3,6
<i>Hsero_4710</i>	-3,5
<i>phnA</i>	-3,5
<i>Hsero_1483</i>	-3,5
<i>dadA</i> (NC_014323 355621..356887)	-3,5
<i>livF</i> (NC_014323 2021134..2021863)	-3,5
<i>holC</i>	-3,5
<i>Hsero_1829</i>	-3,5
<i>Hsero_2716</i>	-3,5
<i>Hsero_3382</i>	-3,5
<i>htpX</i> (NC_014323 3781674..3782496)	-3,5
<i>Hsero_0040</i>	-3,5
<i>Hsero_2127</i>	-3,5
<i>dctM</i> (NC_014323 933843..935124)	-3,5
<i>Hsero_0619</i>	-3,5
<i>Hsero_1221</i>	-3,5
<i>lipB</i>	-3,5
<i>Hsero_4774</i>	-3,5
<i>rumT</i>	-3,4
<i>Hsero_3244</i>	-3,4
<i>Hsero_0312</i>	-3,4
<i>Hsero_2142</i>	-3,4
<i>hemK</i> (NC_014323)	-3,4

4891778..4892612)		
Hsero_4711	-3,4	
Hsero_0279	-3,4	
nfnB (NC_014323 4316043..4316697)	-3,4	
glk	-3,4	
Hsero_2794	-3,4	
afuA	-3,4	
Hsero_0377	-3,4	
Hsero_3953	-3,4	
aer (NC_014323 561015..562680)	-3,4	
gpmB (NC_014323 445019..445664)	-3,4	
umuD	-3,4	
ftsX	-3,4	
hpcH	-3,4	
Hsero_3574	-3,4	
Hsero_0984	-3,4	
arnT (NC_014323 2349675..2351394)	-3,3	
folK	-3,3	
Hsero_2531	-3,3	
Hsero_1858	-3,3	
Hsero_3582	-3,3	
tesA	-3,3	
Hsero_3789	-3,3	
Hsero_1042	-3,3	
vsrB	-3,3	
Hsero_4078	-3,3	
clpB (NC_014323 816026..818708)	-3,3	
purD	-3,3	
Hsero_0647	-3,3	
atoB	-3,3	
pinR	-3,3	
typA	-3,3	
Hsero_0435	-3,3	
Hsero_2214	-3,3	
Hsero_4020	-3,3	
nhaP	-3,3	
kdpE	-3,3	
Hsero_1051	-3,3	
Hsero_1419	-3,3	
degQ (NC_014323 2188162..2189641)	-3,3	
Hsero_2280	-3,3	
Hsero_1180	-3,3	
rpIX	-3,3	
hmgA	-3,3	
Hsero_0744	-3,3	
Hsero_3968	-3,3	
czcR (NC_014323 23341..24049)	-3,3	
Hsero_0487	-3,3	
ggt (NC_014323 4335108..4336692)	-3,3	

nadE (NC_014323 5247733..5249431)	-3,3
mdoG (NC_014323 5488038..5489592)	-3,3
Hsero_1634	-3,3
aceE1	-3,2
hipA (NC_014323 446068..447436)	-3,2
deoR	-3,2
Hsero_1022	-3,2
rpsT	-3,2
hemB	-3,2
pncB (NC_014323 5249459..5250662)	-3,2
dctQ (NC_014323 933286..933847)	-3,2
rplN	-3,2
slpA	-3,2
Hsero_1556	-3,2
Hsero_2659	-3,2
ubiA	-3,2
fhaC (NC_014323 3716537..3718292)	-3,2
edd	-3,2
pcaJ	-3,2
Hsero_0972	-3,2
Hsero_0195	-3,2
tufB (NC_014323 110425..111616)	-3,2
Hsero_2518	-3,2
Hsero_0423	-3,2
Hsero_1128	-3,2
pcaD	-3,2
Hsero_0197	-3,2
mutS	-3,2
cbiG	-3,2
acs (NC_014323 1779610..1781593)	-3,2
Hsero_2254	-3,2
dalR	-3,2
pilJ	-3,2
Hsero_3108	-3,1
cheB (NC_014323 685076..686222)	-3,1
Hsero_0679	-3,1
yibP	-3,1
ndeD (NC_014323 1980405..1981896)	-3,1
Hsero_3875	-3,1
ipk	-3,1
Hsero_3331	-3,1
Hsero_2196	-3,1
Hsero_3969	-3,1
ilvC (NC_014323 4358634..4359651)	-3,1
prpC (NC_014323 1440634..1441930)	-3,1

<i>ddpA1</i>	-3,1
<i>ureD</i>	-3,1
<i>Hsero_3743</i>	-3,1
<i>rseA</i>	-3,1
<i>Hsero_3434</i>	-3,1
<i>hppA</i>	-3,1
<i>Hsero_4326</i>	-3,1
<i>Hsero_0495</i>	-3,1
<i>marR</i> (NC_014323 2100759..2101221)	-3,1
<i>Hsero_4549</i>	-3,1
<i>Hsero_2384</i>	-3,1
<i>Hsero_1842</i>	-3,1
<i>rpoZ</i>	-3,0
<i>prfB</i>	-3,0
<i>panB</i>	-3,0
<i>Hsero_1328</i>	-3,0
<i>Hsero_1880</i>	-3,0
<i>rfaC</i>	-3,0
<i>Hsero_2555</i>	-3,0
<i>nlpD</i> (NC_014323 4354501..4355266)	-3,0
<i>Hsero_2246</i>	-3,0
<i>Hsero_1952</i>	-3,0
<i>gltX</i> (NC_014323 4102167..4103052)	-3,0
<i>Hsero_3330</i>	-3,0
<i>Hsero_1173</i>	-3,0
<i>lexA</i>	-3,0
<i>comFC</i>	-3,0
<i>Hsero_0991</i>	-3,0
<i>rpsA</i>	-3,0
<i>lasT</i>	-3,0
<i>Hsero_0645</i>	-3,0
<i>Hsero_2546</i>	-3,0
<i>Hsero_3877</i>	-3,0
<i>Hsero_1049</i>	-3,0
<i>cheZ</i> (NC_014323 2287916..2288567)	-3,0
<i>cobH</i>	-3,0
<i>copA</i> (NC_014323 1834222..1836457)	-3,0
<i>pyrD</i>	-3,0
<i>Hsero_1438</i>	-3,0
<i>glpD2</i>	-2,9
<i>Hsero_1898</i>	-2,9
<i>Hsero_0732</i>	-2,9
<i>Hsero_4286</i>	-2,9
<i>wcaG</i> (NC_014323 5044313..5045303)	-2,9
<i>Hsero_3907</i>	-2,9
<i>ndk</i>	-2,9
<i>murG</i>	-2,9
<i>argC</i> (NC_014323 4406578..4407616)	-2,9
<i>vgr</i> (NC_014323	-2,9

818819..821654)	
<i>vsrD</i>	-2,9
<i>Hsero_1481</i>	-2,9
<i>dctD</i>	-2,9
<i>Hsero_3435</i>	-2,9
<i>cvpA</i>	-2,9
<i>Hsero_4425</i>	-2,9
<i>livK</i> (NC_014323 5336048..5337242)	-2,9
<i>Hsero_3377</i>	-2,9
<i>argH</i>	-2,9
<i>Hsero_1224</i>	-2,9
<i>papC</i>	-2,9
<i>Hsero_2263</i>	-2,9
<i>serS</i>	-2,9
<i>Hsero_0260</i>	-2,9
<i>guaB</i>	-2,9
<i>fliK</i> (NC_014323 2185157..2185658)	-2,9
<i>Hsero_1550</i>	-2,9
<i>thiL</i>	-2,9
<i>uup</i> (NC_014323 2493204..2494803)	-2,9
<i>rcsB</i>	-2,8
<i>Hsero_3780</i>	-2,8
<i>Hsero_0623</i>	-2,8
<i>Hsero_1499</i>	-2,8
<i>Hsero_1636</i>	-2,8
<i>cpdA</i>	-2,8
<i>Hsero_3773</i>	-2,8
<i>Hsero_2092</i>	-2,8
<i>Hsero_2551</i>	-2,8
<i>Hsero_0971</i>	-2,8
<i>dadX</i>	-2,8
<i>Hsero_3130</i>	-2,8
<i>Hsero_0943</i>	-2,8
<i>Hsero_0321</i>	-2,8
<i>adhP</i>	-2,8
<i>Hsero_3967</i>	-2,8
<i>Hsero_1076</i>	-2,8
<i>cheD</i> (NC_014323 4550119..4551790)	-2,8
<i>Hsero_3383</i>	-2,8
<i>trpD</i> (NC_014323 940345..941356)	-2,8
<i>Hsero_0709</i>	-2,8
<i>fabG</i> (NC_014323 4439891..4440656)	-2,8
<i>htrB</i> (NC_014323 4909734..4910583)	-2,8
<i>Hsero_2108</i>	-2,8
<i>Hsero_2099</i>	-2,8
<i>smpA</i>	-2,8
<i>pcal</i>	-2,8
<i>Hsero_4302</i>	-2,8
<i>dtd</i>	-2,8

<i>Hsero_2954</i>	-2,8
<i>Hsero_1296</i>	-2,8
<i>Hsero_2233</i>	-2,7
<i>Hsero_0018</i>	-2,7
<i>gcp</i>	-2,7
<i>cyaA</i>	-2,7
<i>fmt</i> (NC_014323 4981097..4982051)	-2,7
<i>Hsero_4527</i>	-2,7
<i>Hsero_2699</i>	-2,7
<i>Hsero_2570</i>	-2,7
<i>uppS</i>	-2,7
<i>Hsero_2103</i>	-2,7
<i>asmA</i>	-2,7
<i>cheR</i> (NC_014323 3872147..3872999)	-2,7
<i>hutH</i> (NC_014323 5200854..5202483)	-2,7
<i>Hsero_2492</i>	-2,7
<i>Hsero_0970</i>	-2,7
<i>Hsero_2694</i>	-2,7
<i>pssA</i>	-2,7
<i>Hsero_0756</i>	-2,7
<i>dnaJ</i>	-2,7
<i>coxB</i> (NC_014323 4760997..4762158)	-2,7
<i>aroE</i> (NC_014323 436238..437054)	-2,7
<i>Hsero_0610</i>	-2,7
<i>mreB</i>	-2,7
<i>rnpA</i>	-2,7
<i>nadA</i>	-2,7
<i>ardA</i>	-2,7
<i>Hsero_4027</i>	-2,7
<i>cheR</i> (NC_014323 684246..685080)	-2,7
<i>exbB</i> (NC_014323 3214244..3214976)	-2,7
<i>Hsero_2131</i>	-2,7
<i>cheY</i> (NC_014323 678818..679187)	-2,7
<i>Hsero_1617</i>	-2,7
<i>Hsero_1853</i>	-2,6
<i>lrp</i> (NC_014323 3655128..3655590)	-2,6
<i>Hsero_1915</i>	-2,6
<i>Hsero_4010</i>	-2,6
<i>Hsero_1710</i>	-2,6
<i>Hsero_1679</i>	-2,6
<i>Hsero_1071</i>	-2,6
<i>Hsero_2963</i>	-2,6
<i>Hsero_2144</i>	-2,6
<i>Hsero_2591</i>	-2,6
<i>aroC</i>	-2,6
<i>atpC</i>	-2,6
<i>Hsero_4009</i>	-2,6

<i>gbd</i>	-2,6
<i>leuC</i>	-2,6
<i>Hsero_4791</i>	-2,6
<i>fliJ</i>	-2,6
<i>mdoG</i> (NC_014323 3956888..3958514)	-2,6
<i>Hsero_3807</i>	-2,6
<i>Hsero_0940</i>	-2,6
<i>Hsero_2385</i>	-2,6
<i>mdlB</i>	-2,6
<i>Hsero_3701</i>	-2,6
<i>Hsero_2878</i>	-2,6
<i>tsf</i>	-2,6
<i>Hsero_0865</i>	-2,6
<i>Hsero_4345</i>	-2,6
<i>Hsero_0425</i>	-2,6
<i>Hsero_2709</i>	-2,6
<i>Hsero_3546</i>	-2,6
<i>Hsero_1677</i>	-2,6
<i>cheW</i> (NC_014323 683656..684241)	-2,6
<i>glnQ</i> (NC_014323 78253..78976)	-2,6
<i>lig</i>	-2,6
<i>rpsL</i>	-2,6
<i>Hsero_1726</i>	-2,6
<i>rbsK</i>	-2,6
<i>fliL</i>	-2,6
<i>sbcB</i>	-2,6
<i>pcaR</i> (NC_014323 4590199..4590982)	-2,6
<i>Hsero_2702</i>	-2,6
<i>ftsW</i> (NC_014323 369758..371024)	-2,6
<i>Hsero_3626</i>	-2,6
<i>pgm</i>	-2,6
<i>Hsero_0644</i>	-2,6
<i>Hsero_3509</i>	-2,5
<i>dnaA</i>	-2,5
<i>Hsero_0162</i>	-2,5
<i>Hsero_4447</i>	-2,5
<i>Hsero_0397</i>	-2,5
<i>ldcA</i>	-2,5
<i>fabG</i> (NC_014323 1435201..1435954)	-2,5
<i>aroQ</i>	-2,5
<i>rpmH</i>	-2,5
<i>cheD</i> (NC_014323 1071080..1072958)	-2,5
<i>sodC</i>	-2,5
<i>rsuA</i> (NC_014323 2448890..2449637)	-2,5
<i>crp</i> (NC_014323 2928718..2929396)	-2,5
<i>ubiD</i>	-2,5
<i>Hsero_2489</i>	-2,5
<i>Hsero_2147</i>	-2,5

<i>Hsero_2435</i>	-2,5
<i>Hsero_4079</i>	-2,5
<i>Hsero_4391</i>	-2,5
<i>Hsero_1154</i>	-2,5
<i>phoB</i> (NC_014323 1585066..1585759)	-2,5
<i>purN</i>	-2,5
<i>Hsero_4389</i>	-2,5
<i>pyrG</i>	-2,5
<i>Hsero_0071</i>	-2,5
<i>tas</i>	-2,5
<i>fabZ</i>	-2,5
<i>Hsero_0270</i>	-2,5
<i>rluD</i>	-2,5
<i>tolA</i>	-2,5
<i>Hsero_0148</i>	-2,5
<i>rpsG</i>	-2,5
<i>Hsero_2556</i>	-2,5
<i>Hsero_3489</i>	-2,5
<i>Hsero_4392</i>	-2,5
<i>acpD</i> (NC_014323 3410112..3410739)	-2,5
<i>rhtB</i> (NC_014323 5491643..5492276)	-2,4
<i>mhpD</i> (NC_014323 1272873..1274220)	-2,4
<i>Hsero_3800</i>	-2,4
<i>flhB</i> (NC_014323 2288841..2290017)	-2,4
<i>Hsero_1111</i>	-2,4
<i>Hsero_2442</i>	-2,4
<i>gor</i>	-2,4
<i>Hsero_1535</i>	-2,4
<i>ntrX</i>	-2,4
<i>Hsero_1727</i>	-2,4
<i>Hsero_0083</i>	-2,4
<i>tynA</i>	-2,4
<i>suhB</i>	-2,4
<i>Hsero_4268</i>	-2,4
<i>Hsero_2422</i>	-2,4
<i>Hsero_2774</i>	-2,4
<i>Hsero_2560</i>	-2,4
<i>cheR</i> (NC_014323 3438069..3439371)	-2,4
<i>Hsero_0916</i>	-2,4
<i>Hsero_3281</i>	-2,4
<i>blc</i>	-2,4
<i>acb</i>	-2,4
<i>phaB</i>	-2,4
<i>adiA</i>	-2,4
<i>Hsero_2714</i>	-2,4
<i>def</i> (NC_014323 5371044..5371563)	-2,4
<i>Hsero_2775</i>	-2,4
<i>ptxS</i>	-2,4
<i>cspC</i>	-2,4

<i>infB</i>	-2,4
<i>dacC</i> (NC_014323 1866083..1867184)	-2,4
<i>Hsero_2295</i>	-2,4
<i>Hsero_0266</i>	-2,4
<i>Hsero_3673</i>	-2,4
<i>Hsero_4625</i>	-2,4
<i>Hsero_1969</i>	-2,4
<i>nusA</i>	-2,4
<i>Hsero_0728</i>	-2,4
<i>dxs</i>	-2,4
<i>Hsero_2935</i>	-2,4
<i>Hsero_3427</i>	-2,4
<i>Hsero_4687</i>	-2,4
<i>pykA</i>	-2,4
<i>Hsero_0867</i>	-2,4
<i>Hsero_2914</i>	-2,4
<i>Hsero_2552</i>	-2,4
<i>livK</i> (NC_014323 1883634..1884756)	-2,4
<i>Hsero_3014</i>	-2,4
<i>cysM</i>	-2,4
<i>Hsero_4264</i>	-2,4
<i>Hsero_4167</i>	-2,4
<i>Hsero_3016</i>	-2,4
<i>Hsero_4758</i>	-2,4
<i>dppA</i>	-2,4
<i>mscS</i>	-2,4
<i>Hsero_0729</i>	-2,4
<i>Hsero_3274</i>	-2,4
<i>cbiL</i>	-2,4
<i>Hsero_4760</i>	-2,4
<i>purU</i>	-2,3
<i>nrdA</i>	-2,3
<i>Hsero_4240</i>	-2,3
<i>Hsero_3218</i>	-2,3
<i>fhaB</i> (NC_014323 1103336..1108043)	-2,3
<i>Hsero_4319</i>	-2,3
<i>ctaA</i>	-2,3
<i>galE</i> (NC_014323 5040211..5041222)	-2,3
<i>Hsero_1097</i>	-2,3
<i>prfA</i>	-2,3
<i>folD</i>	-2,3
<i>cysS</i>	-2,3
<i>Hsero_3700</i>	-2,3
<i>Hsero_1131</i>	-2,3
<i>cdsA</i> (NC_014323 89931..90873)	-2,3
<i>prhA</i>	-2,3
<i>Hsero_4192</i>	-2,3
<i>Hsero_1933</i>	-2,3
<i>mntH</i>	-2,3
<i>Hsero_3288</i>	-2,3
<i>Hsero_4604</i>	-2,3

<i>tsr</i> (NC_014323 3452633..3454244)	-2,3
<i>Hsero_2767</i>	-2,3
<i>nusG</i>	-2,3
<i>fdx</i> (NC_014323 5506991..5507294)	-2,3
<i>valS</i>	-2,3
<i>Hsero_1158</i>	-2,3
<i>pill</i>	-2,3
<i>osmC</i>	-2,3
<i>mraY</i>	-2,3
<i>Hsero_2166</i>	-2,3
<i>Hsero_4370</i>	-2,3
<i>hisC</i> (NC_014323 5392919..5394002)	-2,3
<i>rpoE</i> (NC_014323 3695163..3695793)	-2,3
<i>ctaB</i>	-2,3
<i>Hsero_4547</i>	-2,3
<i>Hsero_0510</i>	-2,3
<i>dadA</i> (NC_014323 1293989..1295315)	-2,3
<i>cheW</i> (NC_014323 3437409..3438045)	-2,3
<i>Hsero_3443</i>	-2,3
<i>Hsero_0014</i>	-2,3
<i>fixI</i>	-2,3
<i>Hsero_0915</i>	-2,3
<i>nfnB</i> (NC_014323 4959819..4960413)	-2,3
<i>Hsero_2780</i>	-2,3
<i>ftsQ</i>	-2,3
<i>Hsero_0768</i>	-2,3
<i>Hsero_3152</i>	-2,3
<i>Hsero_2984</i>	-2,2
<i>Hsero_0300</i>	-2,2
<i>Hsero_4513</i>	-2,2
<i>yhiH</i>	-2,2
<i>eda</i>	-2,2
<i>Hsero_3012</i>	-2,2
<i>ftsE</i>	-2,2
<i>htpG</i>	-2,2
<i>comJ</i>	-2,2
<i>mhpC</i>	-2,2
<i>Hsero_3921</i>	-2,2
<i>pcm</i> (NC_014323 533594..534260)	-2,2
<i>Hsero_2700</i>	-2,2
<i>Hsero_0927</i>	-2,2
<i>ppx</i>	-2,2
<i>Hsero_0409</i>	-2,2
<i>map</i> (NC_014323 1134458..1135256)	-2,2
<i>czcS</i> (NC_014323 24045..25449)	-2,2
<i>Hsero_2495</i>	-2,2
<i>rfaL</i>	-2,2

<i>Hsero_1828</i>	-2,2
<i>Hsero_0382</i>	-2,2
<i>Hsero_3555</i>	-2,2
<i>Hsero_0745</i>	-2,2
<i>metK</i>	-2,2
<i>pqiB</i>	-2,2
<i>Hsero_1495</i>	-2,2
<i>uraA</i>	-2,2
<i>Hsero_2313</i>	-2,2
<i>Hsero_3622</i>	-2,2
<i>Hsero_3366</i>	-2,2
<i>Hsero_4344</i>	-2,2
<i>Hsero_1901</i>	-2,2
<i>Hsero_1103</i>	-2,2
<i>Hsero_4562</i>	-2,2
<i>Hsero_4639</i>	-2,2
<i>recA</i>	-2,2
<i>pyrH</i>	-2,2
<i>pgk</i>	-2,2
<i>Hsero_3817</i>	-2,2
<i>rrf</i>	-2,2
<i>Hsero_0925</i>	-2,2
<i>Hsero_0743</i>	-2,2
<i>Hsero_4387</i>	-2,2
<i>murB</i>	-2,2
<i>Hsero_1890</i>	-2,2
<i>Hsero_2572</i>	-2,2
<i>recG</i>	-2,2
<i>motA</i>	-2,2
<i>Hsero_4080</i>	-2,2
<i>lgt</i>	-2,2
<i>rfbB</i>	-2,2
<i>Hsero_3107</i>	-2,2
<i>livK</i> (NC_014323 4577012..4578200)	-2,2
<i>nuoC</i>	-2,2
<i>Hsero_4615</i>	-2,2
<i>tpiA</i>	-2,2
<i>rnc</i>	-2,2
<i>Hsero_0602</i>	-2,2
<i>doc</i>	-2,2
<i>Hsero_2648</i>	-2,2
<i>Hsero_3762</i>	-2,2
<i>Hsero_2596</i>	-2,2
<i>pheS</i>	-2,2
<i>uspA</i> (NC_014323 2589570..2590008)	-2,2
<i>Hsero_3572</i>	-2,2
<i>Hsero_2813</i>	-2,1
<i>kdsA</i>	-2,1
<i>Hsero_0311</i>	-2,1
<i>Hsero_2627</i>	-2,1
<i>Hsero_3633</i>	-2,1
<i>Hsero_4498</i>	-2,1
<i>fadD</i> (NC_014323	-2,1

4375882..4377553)	
<i>fabG</i> (NC_014323 2027043..2027799)	-2,1
<i>Hsero_1711</i>	-2,1
<i>pstS</i>	-2,1
<i>moeA</i> (NC_014323 2134054..2135341)	-2,1
<i>tldE</i>	-2,1
<i>cpsG</i>	-2,1
<i>Hsero_0581</i>	-2,1
<i>Hsero_4390</i>	-2,1
<i>Hsero_4712</i>	-2,1
<i>Hsero_0079</i>	-2,1
<i>rpe</i>	-2,1
<i>murD</i>	-2,1
<i>Hsero_4548</i>	-2,1
<i>Hsero_2776</i>	-2,1
<i>Hsero_3055</i>	-2,1
<i>thrB</i> (NC_014323 1649225..1650236)	-2,1
<i>Hsero_4117</i>	-2,1
<i>Hsero_3337</i>	-2,1
<i>Hsero_3446</i>	-2,1
<i>Hsero_3153</i>	-2,1
<i>Hsero_3575</i>	-2,1
<i>catR</i>	-2,1
<i>Hsero_2933</i>	-2,1
<i>parA</i>	-2,1
<i>Hsero_1802</i>	-2,1
<i>Hsero_2766</i>	-2,1
<i>ppiD</i>	-2,1
<i>Hsero_1719</i>	-2,1
<i>Hsero_2773</i>	-2,1
<i>Hsero_4155</i>	-2,1
<i>tar</i> (NC_014323 496318..498010)	-2,1
<i>Hsero_1803</i>	-2,1
<i>upgC</i>	-2,1
<i>ahpF</i>	-2,1
<i>murF</i>	-2,1
<i>lon</i>	-2,1
<i>fleN</i>	-2,1
<i>fis</i>	-2,1
<i>fdsC</i>	-2,1
<i>aspC</i>	-2,1
<i>Hsero_1501</i>	-2,1
<i>sspB</i>	-2,1
<i>adk</i>	-2,1
<i>Hsero_2289</i>	-2,1
<i>Hsero_4543</i>	-2,1

<i>Hsero_2992</i>	-2,1
<i>grxC</i>	-2,1
<i>hflK</i>	-2,1
<i>livJ</i> (NC_014323 4073769..4074921)	-2,1
<i>Hsero_4467</i>	-2,1
<i>corA</i> (NC_014323 438008..438974)	-2,1
<i>Hsero_4517</i>	-2,1
<i>Hsero_2298</i>	-2,1
<i>rseB</i>	-2,1
<i>ubiH</i>	-2,1
<i>alkA</i>	-2,1
<i>Hsero_3561</i>	-2,1
<i>Hsero_0538</i>	-2,0
<i>Hsero_1418</i>	-2,0
<i>Hsero_1854</i>	-2,0
<i>Hsero_3447</i>	-2,0
<i>exbB</i> (NC_014323 662468..663164)	-2,0
<i>metX</i> (NC_014323 1182028..1183108)	-2,0
<i>rfbG</i>	-2,0
<i>rpsH</i>	-2,0
<i>maeB</i> (NC_014323 3851421..3853734)	-2,0
<i>fadR</i>	-2,0
<i>trxB</i> (NC_014323 1848042..1849116)	-2,0
<i>Hsero_0345</i>	-2,0
<i>cobL</i>	-2,0
<i>feoB</i>	-2,0
<i>Hsero_4782</i>	-2,0
<i>Hsero_2157</i>	-2,0
<i>fabF1</i>	-2,0
<i>Hsero_0082</i>	-2,0
<i>ampD</i>	-2,0
<i>glmS</i> (NC_014323 5056592..5058410)	-2,0
<i>gabD1</i>	-2,0
<i>Hsero_1618</i>	-2,0
<i>ribA</i>	-2,0
<i>guaA</i>	-2,0
<i>Hsero_3147</i>	-2,0
<i>Hsero_0666</i>	-2,0

¹O nível de transcrição diferencial em nitrato representa a razão da média ponderada do RPKM das Bibliotecas Nitrato 1 e 2 pela média ponderada do RPKM das Bibliotecas Amônio 1 e 2. Foram considerados apenas os genes que apresentaram diferença de pelo menos duas vezes na razão do valor de RPKM da biblioteca Nitrato pelo valor de RPKM da Biblioteca Amônio, *p*-valor < 0,05 e cobertura maior que 5x (seção 4.1).